



miR-431-5p通过调控AKT1抑制胰腺癌细胞增殖、迁移、侵袭和促进凋亡研究

汪俊州, 王义刚, 孙雅轩

引用本文:

汪俊州,王义刚,孙雅轩. miR-431-5p通过调控AKT1抑制胰腺癌细胞增殖、迁移、侵袭和促进凋亡研究[J]. 蚌埠医学院学报, 2022, 47(6): 716-721.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2022.06.004>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

miR-367通过靶向调控TET2对子宫内膜癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响

Effects of miR-367 on proliferation, migration and invasion of endometrial cancer cells by targeted regulating TET2

蚌埠医学院学报. 2022, 47(5): 580-585 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2022.05.005>

淫羊藿通过miR-19a-3p对高糖高脂诱导的胰岛β细胞损伤的影响及机制研究

Effects of Epimedium herb through miR-19a-3p on islet β cells damage induced by high glucose and lipid and its mechanism

蚌埠医学院学报. 2020, 45(6): 725-730 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2020.06.007>

miR-20a靶向PTEN调控垂体腺瘤细胞的增殖与侵袭

Study on the miR-20a regulating the proliferation and invasion of pituitary adenoma cells by targeting PTEN

蚌埠医学院学报. 2022, 47(5): 561-565 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2022.05.001>

外泌体介导的miR-18b-5p调控NEDD9对乳腺癌细胞增殖、迁移、侵袭的影响

Study on the exosome-mediated miR-18b-5p in promoting the proliferation, migration and invasion of breast cancer cells by regulating NEDD9

蚌埠医学院学报. 2022, 47(2): 141-145 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2022.02.001>

lncRNA EGOT靶向miR-320a对LPS诱导肺泡上皮细胞炎症反应和细胞凋亡的影响

Effect of lncRNA EGOT on LPS-induced inflammation and apoptosis of alveolar epithelial cells by targeting miR-320a

蚌埠医学院学报. 2021, 46(10): 1325-1330 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2021.10.001>

# miR-431-5p 通过调控 AKT1 抑制胰腺癌 细胞增殖、迁移、侵袭和促进凋亡研究

汪俊州, 王义刚, 孙雅轩

**[摘要]** **目的:** 研究 miR-431-5p 对胰腺癌细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响和潜在的分子机制。 **方法:** qRT-PCR 检测人正常胰腺上皮细胞 hTERT-HPNE 和胰腺癌细胞 CFPAC-1 和 PANC-1 中 miR-431-5p 表达水平。转染 miR-431-5p 模拟物至胰腺癌 CFPAC-1 细胞中过表达 miR-431-5p 后, MTT 法测定细胞增殖活性, Transwell 检测细胞迁移和侵袭, 流式细胞术检测细胞凋亡, Western blotting 检测细胞中 Cyclin D1, p21, Bax, Bcl-2, E-cadherin, MMP-2 和丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (AKT1) 蛋白表达。双荧光素酶报告基因实验验证 miR-431-5p 与 AKT1 的调控关系。 **结果:** 与 hTERT-HPNE 细胞相比, 胰腺癌细胞 PANC-1 和 CFPAC-1 中 miR-431-5p 表达量降低 ( $P < 0.05$ )。过表达 miR-431-5p 后, CFPAC-1 细胞活性、迁移和侵袭细胞数降低, 凋亡率升高, Cyclin D1、Bcl-2 和 MMP-2 蛋白表达水平降低, p21、Bax 和 E-cadherin 蛋白表达水平升高, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05 \sim P < 0.01$ )。双荧光素酶报告基因实验结果显示, miR-431-5p 在 CFPAC-1 细胞中靶向负调控 AKT1 表达。同时过表达 miR-431-5p 和 AKT1 后, CFPAC-1 细胞活性、迁移和侵袭细胞数升高, 凋亡率降低, Cyclin D1、Bcl-2 和 MMP-2 蛋白表达水平升高, p21、Bax 和 E-cadherin 蛋白表达水平降低, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。 **结论:** miR-431-5p 通过靶向抑制 AKT1 降低胰腺癌 CFPAC-1 细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 并促进细胞凋亡, 可能是胰腺癌的潜在分子治疗靶点。

**[关键词]** 胰腺肿瘤; miR-431-5p; 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1

[中图分类号] R 735.9

[文献标志码] A

DOI:10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2022.06.004

## Study on the miR-431-5p inhibiting the proliferation, migration, invasion and promoting the apoptosis of pancreatic cancer cells by regulating AKT1

WANG Jun-zhou, WANG Yi-gang, SUN Ya-xuan

(Department of Hepatobiliary Surgery, Panzhihua Central Hospital, Panzhihua Sichuan 617067, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of miR-431-5p on the proliferation, migration, invasion and apoptosis of pancreatic cancer cells, and its underlying mechanism. **Methods:** The qRT-PCR was used to detect the expression levels of miR-431-5p in human normal pancreatic epithelial cells hTERT-HPNE and pancreatic cancer cells CFPAC-1 and PANC-1. After the miR-431-5p mimics were transfected into the pancreatic cancer CFPAC-1 cells to overexpress miR-431-5p, the MTT assay was used to detect the cell proliferation activity, the Transwell assay was used to detect the cell migration and invasion, the flow cytometry was used to detect the apoptosis, and the Western blotting was used to detect the expression levels of Cyclin D1, p21, Bax, Bcl-2, E-cadherin, MMP-2 and AKT1 proteins. The regulatory relationship between miR-431-5p and AKT1 was investigated using the dual luciferase reporter gene experiment. **Results:** Compared with hTERT-HPNE cells, the expression levels of miR-431-5p in pancreatic cancer cell PANC-1 and CFPAC-1 significantly decreased ( $P < 0.05$ ). After the miR-431-5p in CFPAC-1 cells was overexpressed, the cells activity and number of migrating and invading cells decreased ( $P < 0.05$ ), the apoptosis rate increased ( $P < 0.05$ ), the expression levels of Cyclin D1, Bcl-2 and MMP-2 protein decreased ( $P < 0.05$ ), and the expression levels of p21, Bax and E-cadherin protein increased ( $P < 0.05$  to  $P < 0.01$ ). The results of the dual luciferase reporter gene experiment showed that the miR-431-5p negatively regulated the AKT1 expression in CFPAC-1 cells. After the miR-431-5p and AKT1 in CFPAC-1 cells were overexpressed, the CFPAC-1 cell activity, the number of migrating and invading cells increased, the apoptosis rate decreased, the protein expression levels of Cyclin D1, Bcl-2 and MMP-2 increased, while the protein expression levels of p21, Bax and E-cadherin decreased, and the differences of which were statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusions:** The miR-431-5p can inhibit the proliferation, migration and invasion of pancreatic cancer CFPAC-1 cells, and promote apoptosis by targeting AKT1. It may be a potential molecular therapeutic target for pancreatic cancer.

**[Key words]** pancreatic neoplasms; miR-431-5p; AKT1

[收稿日期] 2019-10-29 [修回日期] 2021-04-19

[基金项目] 四川省卫生健康委员会科研课题(19PJ116)

[作者单位] 四川省攀枝花市中心医院 肝胆外科, 617067

[作者简介] 汪俊州(1981-), 男, 主治医师。

胰腺癌发病隐匿、进展速度快, 且预后较差<sup>[1-2]</sup>。目前, 胰腺癌的发病机制尚不明确, 基因靶点治疗是胰腺癌研究的热点。微小 RNA (micro RNA, miRNA) 可在转录后调控靶基因的表达, 参与

细胞增殖、凋亡、转移和分化等过程<sup>[3]</sup>。miR-431-5p 在肺癌等肿瘤中表达下调,靶向上调其表达可抑制癌细胞的增殖、迁移、侵袭及血管生成<sup>[4-6]</sup>,但其对胰腺癌细胞生物学行为的影响及其作用机制目前还不清楚。TargetsCan 生物信息学软件预测显示,丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (AKT1) 可能是 miR-431-5p 的靶基因。AKT1 已被确定在胰腺癌等多种肿瘤中发挥致癌基因作用<sup>[7]</sup>。但 miR-431-5p 能否通过调控 AKT1 影响胰腺癌细胞的生物学行为尚不清楚。本研究主要探讨了 miR-431-5p 对胰腺癌细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响及其能否通过调控 AKT1 表达发挥作用,以期寻找胰腺癌治疗潜在的分子靶点提供参考。现作报道。

## 1 材料与方法

1.1 材料 人胰腺癌细胞株 PANC-1、CFPAC-1 和人正常胰腺细胞株 hTERT-HPNE 购自美国 ATCC; DMEM 高糖培养基、牛血清白蛋白、胰蛋白酶 Trypsin、二甲基亚砷 (DMSO) 和四氮唑蓝 (MTT) 购自 Sigma-Aldrich 公司; Transwell 板购自美国 Corning 公司; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自 Gibco 公司; Lipofectamine 2000 转染试剂、RNA 提取试剂 Trizol、real-time PCR 试剂盒、反转录试剂盒 (RT-PCR) 购自美国 Invitrogen 公司; Annexin V-FITC 流式法细胞凋亡检测试剂盒购自美国 BD 公司; miR-431-5p 模拟物 (mimics) 及模拟对照序列 (miR-NC)、miR-431-5p 抑制剂 (anti-miR-431-5p) 及阴性对照序列 (anti-miR-NC)、AKT1 过表达载体 (pcDNA 3.1-AKT1) 及空载体 (pcDNA3.1) 购自上海吉玛制药技术有限公司; 双荧光素酶活性检测试剂盒购自美国 Promega 公司; 显微镜、酶标仪、发光仪及 Real-time PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司; 流式细胞仪购自美国 BD 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 PANC-1、CFPAC-1 和 hTERT-HPNE 细胞均用含 10% FBS、1% 青霉素-链霉素的 DMEM 高糖培养基培养。培养箱环境: 温度 37 °C、CO<sub>2</sub> 体积分数 5%、湿度 95%。待细胞生长密度至 80% 左右时, Trypsin 消化, 进行传代培养。

1.2.2 细胞转染和分组 对数生长期的 CFPAC-1 细胞, 以每孔  $2 \times 10^5$  个细胞接种于 6 孔板中。待细胞生长密度至 60% 时, 更换为不含 FBS 的 DMEM 高糖培养基。参照 Lipofectamine 2000 试剂盒说明书, 分别将 miR-NC (miR-NC 组)、miR-431-5p mimics

(miR-431-5p 组)、anti-miR-NC (anti-miR-NC 组)、anti-miR-431-5p (anti-miR-431-5p 组)、miR-431-5p mimics 与 pcDNA3.1 (miR-431-5p + pcDNA3.1 组)、miR-431-5p mimics 与 pcDNA3.1-AKT1 (miR-431-5p + pcDNA3.1-AKT1 组) 转染至 CFPAC-1 细胞。转染 6 h 后, 弃培养液, 换成含 10% FBS DMEM 高糖培养基。继续培养至 48 h, 收集细胞用于后续实验。

1.2.3 Real-time PCR 检测 RNA 的表达 收集各组 CFPAC-1 细胞, 用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA, 然后根据反转录试剂盒说明书合成 cDNA, 反应程序为: 50 °C 10 min; 37 °C 50 min; 72 °C 10 min。测定浓度和纯度, -80 °C 保存。取 cDNA 为模板, 按照 real-time PCR 试剂盒的说明书进行反应, 反应程序为: 94 °C 4 min; 90 °C 30 s; 60 °C 30 s; 72 °C 45 s, 40 个循环; 72 °C 5 min。引物如下: miR-431-5p 上游 5'-ACG CGT GTC TTG CAG GCC GT-3', 下游 5'-ATC CAG TGC AGG GTC CGA GG-3'; AKT1 上游 5'-TCT ATG GCG CTG AGA TTG TG-3', 下游 5'-CTT AAT GTG CCC GTC CTT GT-3'。运用 Bio-Rad PCR 系统进行数据分析。

1.2.4 MTT 实验检测细胞增殖 miR-NC 组、miR-431-5p 组、miR-431-5p + pcDNA3.1 组和 miR-431-5p + pcDNA3.1-AKT1 组细胞, 以每孔  $2 \times 10^3$  个细胞接种于 96 孔板中。分别培养 24 h、48 h 和 72 h 后, 每孔加入 20  $\mu$ L MTT 溶液 (5 mg/mL)。培养箱中继续培养 4 h 后, 弃上清液, 加入 150  $\mu$ L DMSO, 室温振荡 5 min, 酶标仪测定 490 nm 吸光度 (OD) 值。

1.2.5 流式细胞术测定细胞凋亡 miR-NC 组、miR-431-5p 组、miR-431-5p + pcDNA3.1 组和 miR-431-5p + pcDNA3.1-AKT1 组细胞, 以每孔  $1 \times 10^4$  个接种于 6 孔板中。培养 48 h 后, Trypsin 消化, 收集细胞。按照 Annexin V-FITC 凋亡试剂盒说明书, 加入 5  $\mu$ L Annexin V-FITC, 混匀后室温孵育 10 min。加入 5  $\mu$ L 碘化丙啶, 混匀后室温孵育 10 min, 上流式细胞仪检测。

1.2.6 Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭 miR-NC 组、miR-431-5p 组、miR-431-5p + pcDNA3.1 组和 miR-431-5p + pcDNA3.1-AKT1 组细胞用不含 FBS 的 DMEM 高糖培养基稀释为每毫升  $2 \times 10^5$  个。迁移实验: Transwell 小室置于 24 孔板中, 上室加入 100  $\mu$ L 稀释后的各组细胞悬液, 下室加入 500  $\mu$ L 含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基。培养 48 h 后, 吸弃培养基。取出小室, 棉签拭去上层小室的细胞,

4% 甲醇固定细胞 30 min, 0.4% 结晶紫染色 15 min。显微镜观察, 随机选取 5 个视野, 计数迁移细胞。侵袭实验: Matrigel 基质胶 4 °C 融化后, 无血清 DMEM 高糖培养基 1:8 比例稀释, 然后铺于 Transwell 小室上层。自然晾干后, 加入 100  $\mu$ L 稀释后的各组细胞悬液, 下室加入 500  $\mu$ L 含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基。后续操作与迁移实验相同。

1.2.7 Western blotting 法检测细胞中 Cyclin D1、p21、Bax、Bcl-2、E-cadherin、MMP-2 和 AKT1 蛋白表达 miR-NC 组、miR-431-5p 组、miR-431-5p + pcDNA3.1 组和 miR-431-5p + pcDNA3.1-AKT1 组细胞, 以每孔  $1 \times 10^4$  个接种于 6 孔板中。培养 48 h 后, Trypsin 消化, 收集细胞。加入 RIPA 细胞裂解液, 提取细胞中总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。取适量蛋白溶液, 100 °C 煮沸 5 min。蛋白变性后, 每孔 25  $\mu$ g 蛋白行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)。电泳后, 电转移至聚偏乙烯二氟 (PVDF) 膜, 于 5% 脱脂奶粉中封闭 2 h。分别置于 Cyclin D1、p21、Bax、Bcl-2、E-cadherin、MMP-2 和 AKT1 一抗孵育液中, 4 °C 孵育过夜。TBST 洗膜后, 置于辣根过氧化物酶标记的二抗孵育液中, 37 °C 孵育 1 h。TBST 洗膜, 加入 ELC 显影液, 避光显影, 凝胶成像系统曝光拍照。

1.2.8 双荧光素酶报告实验 PCR 扩增含 miR-431-5p 结合位点的 AKT1 的基因序列, 分别构建的 AKT1 的野生型 (WT-AKT1) 和突变型 (MUT-AKT1) 双荧光素酶报告载体, 由上海吉玛制药技术有限公司完成。CFPAC-1 细胞以  $2 \times 10^5$  个接种于 6 孔板中, 待细胞生长密度至 60% 时, 更换为不含 FBS 的 DMEM 高糖培养基。参照 Lipofectamine 2000 试剂盒说明书, 分别将 WT-AKT1、MUT-AKT1 与 miR-431-5p mimics 或 miR-NC 共转染至 CFPAC-1 细胞。转染 6 h 后, 更换含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基。继续培养至 48 h, 收集细胞, 加入 RIPA 细胞裂解液充分裂解细胞, 收集上清液。参照双荧光素酶活性检测试剂盒操作说明, 检测荧光素酶活性。

1.3 统计学方法 采用独立样本 *t* 检验、单因素方差分析和 *q* 检验。

## 2 结果

2.1 miR-431-5p 在胰腺癌细胞 PANC-1、CFPAC-1 和正常胰腺上皮细胞 hTERT-HPNE 中的表达 qRT-PCR 结果表明, 与 hTERT-HPNE 细胞相比, 胰腺癌细胞 PANC-1 和 CFPAC-1 组的 miR-431-5p 表

达量降低, 且 CFPAC-1 细胞 miR-431-5p 表达量低于 PANC-1 组, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (见表 1), 因此, 选用胰腺癌细胞株 CFPAC-1 进行后续实验。

表 1 miR-431-5p 在 PANC-1、CFPAC-1 和 hTERT-HPNE 细胞中的表达 ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	<i>n</i>	miR-431-5p
hTERT-HPNE	9	1.10 $\pm$ 0.08
PANC-1	9	0.89 $\pm$ 0.06 *
CFPAC-1	9	0.43 $\pm$ 0.03 * $\Delta$
<i>F</i>	—	96.96
<i>P</i>	—	<0.01
<i>MS</i> 组内	—	0.352

*q* 检验: 与 hTERT-HPNE 细胞组比较 \*  $P < 0.05$ ; 与 PANC-1 细胞组比较  $\Delta P < 0.05$

2.2 过表达 miR-431-5p 抑制胰腺癌 CFPAC-1 细胞增殖、促进细胞凋亡 qRT-PCR 结果表明, 与 miR-NC 组相比, miR-431-5p 组细胞中 miR-431-5p 表达量上升 ( $P < 0.01$ ), 表明 miR-431-5p mimics 转染成功, 细胞中 miR-431-5p 过表达。MTT、流式细胞术结果显示, 与 miR-NC 组相比, miR-431-5p 组细胞活性在 48 h、72 h 均下降, 细胞凋亡率上升, Cyclin D1 和 Bcl-2 蛋白表达下调, p21 和 Bax 蛋白表达上调, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ ) (见图 1、表 2)。

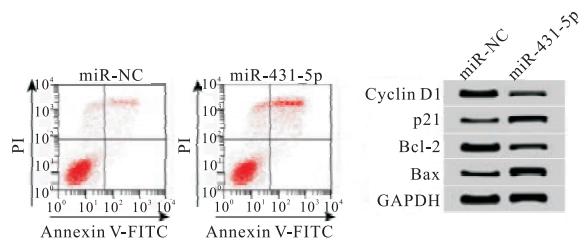


图 1 过表达 miR-431-5p 对细胞 CFPAC-1 凋亡的影响

2.3 过表达 miR-431-5p 抑制胰腺癌细胞 CFPAC-1 迁移、侵袭 Transwell 结果显示, 与 miR-NC 组相比, miR-431-5p 组细胞迁移细胞数和侵袭细胞数均下降, E-cadherin 蛋白表达上升, N-cadherin 蛋白表达下降, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ ) (见表 3、图 2)。

2.4 miR-431-5p 靶向调控 AKT1 Targetscan 软件预测结果显示, AKT1 的 3'UTR 含有与 miR-431-5p 互补的核苷酸序列 (见图 3)。双荧光素酶报告系统结果所示, 与共转染 WT-AKT1 的 miR-NC 组相比, 共转染 WT-AKT1 的 miR-431-5p 组荧光素酶相对活性下降 ( $P < 0.01$ ) (见表 4); 与共转染 MUT-AKT1 的 miR-NC 组相比, 共转染 MUT-AKT1 的 miR-431-



5p 组荧光素酶相对活性差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); Western blotting 结果表明, 与 miR-NC 组相比, miR-431-5p 组的 AKT1 蛋白表达量下降 ( $P <$

$0.05$ ); 与 anti-miR-NC 组相比, anti-miR-431-5p 组的 AKT1 蛋白表达量上升 ( $P < 0.05$ ) (见表 5 和图 4)。

表 2 过表达 miR-431-5p 对细胞 CFPAC-1 增殖、凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	n	miR-431-5p	OD 值			凋亡率/%	Cyclin D1	p21	Bcl-2	Bax
			24 h	48 h	72 h					
miR-NC	3	0.31 ± 0.03	0.38 ± 0.03	0.83 ± 0.05	1.53 ± 0.06	8.24 ± 0.57	0.69 ± 0.03	0.16 ± 0.01	0.84 ± 0.02	0.24 ± 0.03
miR-431-5p	3	0.76 ± 0.05	0.36 ± 0.03	0.44 ± 0.04	0.61 ± 0.05	26.67 ± 1.58	0.21 ± 0.02	0.59 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.79 ± 0.02
t	—	13.37	0.82	10.55	20.40	19.01	23.06	33.31	34.29	26.42
P	—	<0.01	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

表 3 过表达 miR-431-5p 对细胞 CFPAC-1 迁移、侵袭的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	n	细胞数		E-cadherin	N-cadherin
		迁移	侵袭		
miR-NC	3	97.00 ± 2.94	78.67 ± 2.05	0.28 ± 0.02	0.69 ± 0.01
miR-431-5p	3	38.00 ± 1.63	25.67 ± 2.49	0.85 ± 0.01	0.20 ± 0.03
t	—	30.40	28.46	44.15	26.84
P	—	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

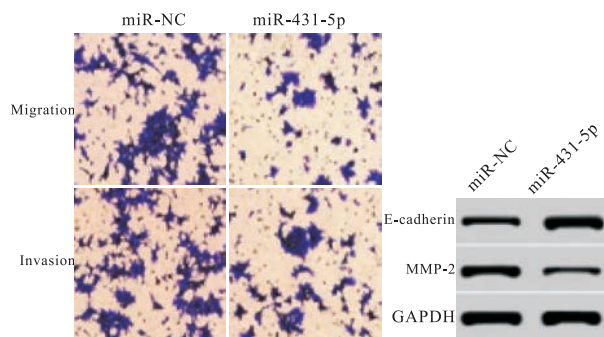


图 2 过表达 miR-431-5p 对细胞 CFPAC-1 迁移、侵袭的影响

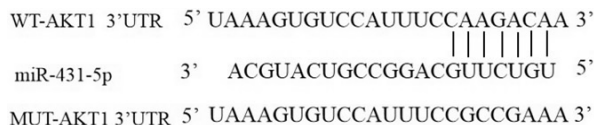


图 3 核苷酸序列

表 4 双荧光素酶报告实验

分组	n	WT-AKT1	MUT-AKT1
miR-NC	3	1.10 ± 0.03	1.12 ± 0.02
miR-431-5p	3	0.37 ± 0.04	1.08 ± 0.03
t	—	25.29	1.92
P	—	<0.01	>0.05

2.5 过表达 AKT1 逆转 miR-431-5p 对胰腺癌细胞 CFPAC-1 增殖、凋亡的作用 MTT、流式细胞术、Western blotting 结果显示, 与 miR-431-5p +

pcDNA3.1 组相比, miR-431-5p + pcDNA3.1-AKT1 组细胞增殖活性上升, 细胞凋亡率下降, AKT1、Cyclin D1 和 Bcl-2 蛋白表达上升, p21 和 Bax 蛋白表达下调, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (见图 5、表 6)。

表 5 miR-431-5p 调控 AKT1 蛋白的表达

分组	n	AKT1
miR-NC	9	0.86 ± 0.06
miR-431-5p	9	0.31 ± 0.02 *
anti-miR-NC	9	0.88 ± 0.06
anti-miR-431-5p	9	1.25 ± 0.08 $\Delta$
F	—	128.60
P	—	<0.01
MS 组内	—	0.450

q 检验: 与 miR-NC 组比较 \*  $P < 0.05$ ; 与 anti-miR-NC 组比较  $\Delta P < 0.05$

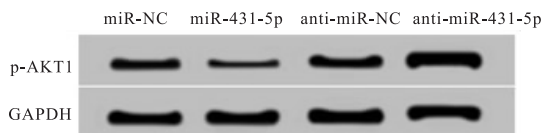


图 4 miR-431-5p 靶向调控 AKT1 表达

2.6 过表达 AKT1 逆转对 miR-431-5p 对胰腺癌细胞 CFPAC-1 迁移、侵袭的作用 Transwell、Western blotting 结果显示, 与 miR-431-5p + pcDNA3.1 组相比, miR-431-5p + pcDNA3.1-AKT1 组的 CFPAC-1 迁移细胞数和侵袭细胞数均上升, E-cadherin 蛋白表达量下降, N-cadherin 蛋白表达量上升, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (见表 7、图 6)。

### 3 讨论

miRNA 是一类小分子非编码 RNA, 参与调控肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭等恶性生物学行为, 是肿

瘤治疗的潜在分子靶点<sup>[8-10]</sup>。KONG 等<sup>[11]</sup>研究发现,miR-431-5p 在肝癌组织和细胞系中表达下调,过表达 miR-431-5p 可通过靶向 UROC28 影响 EMT 过程,抑制肝癌细胞增殖和侵袭。但也有报道<sup>[12]</sup>

称,过表达 miR-431-5p 靶向下调 Smad4 促进肺癌细胞增殖,并抑制肺癌细胞凋亡,发挥促癌基因作用。目前,miR-431-5p 对胰腺癌细胞恶性生物学行为的影响还未明确。

表 6 过表达 AKT1 逆转 miR-431-5p 对细胞 CFPAC-1 增殖、凋亡的作用

分组	n	OD 值			凋亡率/%	AKT1	Cyclin D1	p21	Bcl-2	Bax
		24 h	48 h	72 h						
miR-NC	9	0.38 ± 0.03	0.83 ± 0.05	1.53 ± 0.06	8.24 ± 0.57	0.84 ± 0.02	0.69 ± 0.03	0.16 ± 0.01	0.84 ± 0.02	0.24 ± 0.03
miR-431-5p	9	0.36 ± 0.03	0.44 ± 0.04 *	0.61 ± 0.05 *	26.67 ± 1.28 *	0.33 ± 0.03 *	0.21 ± 0.02 *	0.59 ± 0.02 *	0.28 ± 0.02 *	0.79 ± 0.02 *
miR-431-5p + pcDNA3.1	9	0.36 ± 0.03	0.46 ± 0.04	0.63 ± 0.05	26.26 ± 1.18	0.33 ± 0.03	0.22 ± 0.02	0.59 ± 0.02	0.30 ± 0.03	0.80 ± 0.03
miR-431-5p + pcDNA3.1-AKT1	9	0.37 ± 0.03	0.68 ± 0.06 <sup>△</sup>	1.16 ± 0.06 <sup>△</sup>	16.38 ± 0.86 <sup>△</sup>	0.59 ± 0.02 <sup>△</sup>	0.47 ± 0.01 <sup>△</sup>	0.34 ± 0.02 <sup>△</sup>	0.58 ± 0.02 <sup>△</sup>	0.54 ± 0.02 <sup>△</sup>
F	—	0.31	44.94	194.84	228.14	276.16	349.94	405.54	400.76	321.65
P	—	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
MS <sub>组内</sub>	—	0.000	0.209	0.594	233.578	0.180	0.158	0.209	0.210	0.209

q 检验:与 miR-NC 组比较 \*P < 0.05; 与 miR-431-5p + pcDNA3.1 组比较<sup>△</sup>P < 0.05

表 7 过表达 AKT1 能逆转 miR-431-5p 对细胞 CFPAC-1 迁移、侵袭的作用 ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	n	细胞数		E-cadherin	N-cadherin
		迁移	侵袭		
miR-NC	9	97.00 ± 2.94	78.67 ± 2.05	0.28 ± 0.02	0.69 ± 0.01
miR-431-5p	9	38.00 ± 1.63 *	25.67 ± 2.49 *	0.83 ± 0.02 *	0.20 ± 0.03 *
miR-431-5p + pcDNA3.1	9	37.00 ± 0.82	26.33 ± 3.68	0.82 ± 0.02	0.21 ± 0.03
miR-431-5p + pcDNA3.1-AKT1	9	58.67 ± 2.05 <sup>△</sup>	42.67 ± 2.87 <sup>△</sup>	0.54 ± 0.03 <sup>△</sup>	0.41 ± 0.03 <sup>△</sup>
F	—	577.77	229.97	392.52	226.11
P	—	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
MS <sub>组内</sub>	—	2 362.007	1 850.227	0.206	0.158

q 检验:与 miR-NC 组比较 \*P < 0.05; 与 miR-431-5p + pcDNA3.1 组比较<sup>△</sup>P < 0.05

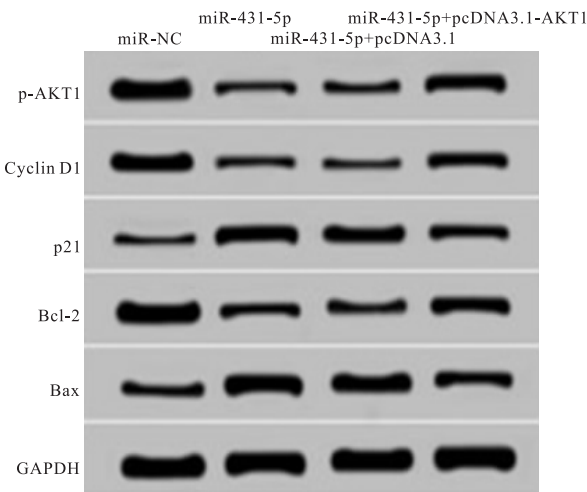


图5 过表达AKT1逆转miR-431-5p对细胞CFPAC-1增殖、凋亡蛋白表达的作用

本研究发现,miR-431-5p 在胰腺癌细胞中表达量显著降低,过表达 miR-431-5p 可抑制胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭,并促进细胞凋亡,提示 miR-431-5p 在胰腺癌中发挥抗癌基因作用,是胰腺癌治疗的潜在分子靶点。为了进一步探讨 miR-431-5p 影响

胰腺癌细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的作用机制,本研究通过生物信息学软件预测显示,AKT1 可能是 miR-431-5p 生物靶基因。通过双荧光素酶报告基因实验显示,miR-431-5p 可与 AKT1 的 3'UTR 靶向结合。此外,过表达 CFPAC-1 细胞中 miR-431-5p 表达后,AKT1 蛋白表达降低;而沉默 miR-431-5p 表达后,AKT1 蛋白表达升高。这些结果证实了 miR-431-5p 靶向负调控 AKT1 表达。

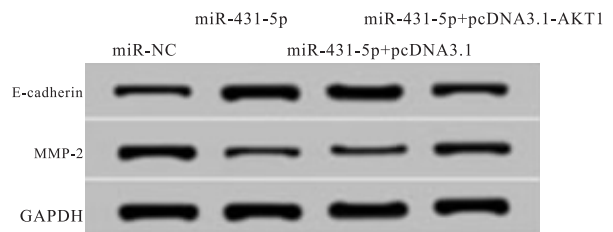


图6 过表达AKT1逆转miR-431-5p对细胞CFPAC-1迁移、侵袭的作用

AKT1 在多种肿瘤组织中表达异常,与肿瘤增殖、进展和放疗耐受有关<sup>[13-15]</sup>。研究<sup>[16]</sup>显示,薯蓣皂苷通过上调 miR-149-3p 表达进而靶向抑制

AKT1 表达,降低了胰腺癌细胞的增殖能力,并促进细胞凋亡。非小细胞肺癌组织中 miR-512-3p 表达降低,其通过靶向上调 AKT1 促进非小细胞肺癌细胞增殖<sup>[17]</sup>。本研究发现,过表达 AKT1 可逆转上调 miR-431-5p 对胰腺癌 CFPAC-1 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的作用,提示过表达 miR-431-5p 通过靶向下调 AKT1 抑制胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭,并诱导细胞凋亡。

综上所述,miR-431-5p 在胰腺癌细胞中呈低表达,过表达 miR-431-5p 可抑制胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭,并促进细胞凋亡,其可能通过靶向抑制 AKT1 发挥作用,miR-431-5p/AKT1 轴为胰腺癌的分子靶向治疗提供了新的方向。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [1] WANG HW, JIAO HM, JIANG ZR, *et al.* Propofol inhibits migration and induces apoptosis of pancreatic cancer PANC-1 cells through miR-34a-mediated E-cadherin and LOC285194 signals[J]. *Bioengineered*, 2020, 11(1):510.
- [2] VON HOFF DD, ERVIN T, ARENA FP, *et al.* Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine[J]. *N Engl J Med*, 2013, 369(18):1691.
- [3] ABREU FB, LIU XY, TSONGALIS GJ. miRNA analysis in pancreatic cancer; the Dartmouth experience[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2017, 55(5):755.
- [4] JIANG Q, CHENG L, MA DY, *et al.* FBXL19-AS1 exerts oncogenic function by sponging miR-431-5p to regulate RAF1 expression in lung cancer[J]. *BioSci Rep*, 2019, 39(1):1.
- [5] SU WB, LIU ZY. MiR-431 inhibits colorectal cancer cell invasion via repressing CUL4B[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(10):3047.
- [6] LIU Y, LI L, LIU Z, *et al.* Downregulation of MiR-431 expression associated with lymph node metastasis and promotes cell invasion in papillary thyroid carcinoma [J]. *Cancer Biomark*, 2018, 22(4):727.
- [7] XU RL, HE W, TANG J, *et al.* Primate-specific miRNA-637

inhibited tumorigenesis in human pancreatic ductal adenocarcinoma cells by suppressing Akt1 expression [J]. *Exp Cell Res*, 2018, 363(2):310.

- [8] WU XF. Expressions of miR-21 and miR-210 in breast cancer and their predictive values for prognosis [J]. *Iran J Public Health*, 2020, 49(1):21.
- [9] CHEN YS, LU Y, REN YL, *et al.* Starvation-induced suppression of DAZAPI by miR-10b integrates splicing control into TSC2-regulated oncogenic autophagy in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Theranostics*, 2020, 10(11):4983.
- [10] LI J, LIN TY, CHEN L, *et al.* miR-19 regulates the expression of interferon-induced genes and MHC class I genes in human cancer cells [J]. *Int J Med Sci*, 2020, 17(7):953.
- [11] KONG Q, HAN J, DENG H, *et al.* miR-431-5p alters the epithelial-to-mesenchymal transition markers by targeting UROC28 in hepatoma cells [J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11(3):6489.
- [12] LI S, SUN Z, CHEN T, *et al.* The role of miR-431-5p in regulating pulmonary surfactant expression *in vitro* [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2019, 24(2):25.
- [13] DU YM, WANG YB. MiR-637 inhibits proliferation and invasion of hepatoma cells by targeted degradation of AKT1 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(2):567.
- [14] YAO J, ZHANG P, LI J, *et al.* MicroRNA-215 acts as a tumor suppressor in breast cancer by targeting AKT serine/threonine kinase 1 [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(1):1097.
- [15] WANG C, LIU H, QIU Q, *et al.* TCRP1 promotes NIH/3T3 cell transformation by over-activating PDK1 and AKT1 [J]. *Oncogenesis*, 2017, 6(4):e323.
- [16] SI L, XU L, YIN L, *et al.* Potent effects of dioscin against pancreatic cancer via miR-149-3P-mediated inhibition of the Akt1 signalling pathway [J]. *Br J Pharmacol*, 2017, 174(7):553.
- [17] ZHANG G, CHEN HX, YANG SN, *et al.* MAG1-IT1 stimulates proliferation in non-small cell lung cancer by upregulating AKT1 as a ceRNA [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(2):691.

( 本文编辑 刘梦楠 )