

本文引文格式:李雪颀,周青宏,潘春风,等. miR-9-5p 通过 SIRT1/NF- κ B 通路促进胰腺癌细胞凋亡的实验研究[J]. 右江民族医学院学报, 2023, 45(2):195-201.

【论著与临床报道】

miR-9-5p 通过 SIRT1/NF- κ B 通路促进 胰腺癌细胞凋亡的实验研究

李雪颀^{1,2}, 周青宏^{1,2}, 潘春风^{1,2}, 王语阳^{1,2}, 苏拾香^{1,2}, 岑兰英^{1,2}, 潘路娟¹, 覃月秋¹

(1. 右江民族医学院附属医院, 广西 百色 533000;
2. 右江民族医学院研究生学院, 广西 百色 533000)

摘要:目的 探讨 miR-9-5p 通过调控 SIRT1 及 NF- κ B 表达对胰腺癌细胞(PANC-1)凋亡相关基因 Caspase-3 表达的影响。方法 使用 miR-9-5p mimic 慢病毒转染人胰腺癌 PANC-1 细胞建立稳转株(mimic 组),空载体转染作为阴性对照组(NC 组),以未处理的 PANC-1 细胞作为空白对照组(空白组)。采用 qRT-PCR 检测 PANC-1 细胞中 miR-9-5p、SIRT1 及 Caspase-3 mRNA 的表达水平;Western Blot 检测 SIRT1、NF- κ B 通路相关蛋白及 Caspase-3 蛋白表达量;ELISA 检测细胞裂解液中 SIRT1 及 Caspase-3 蛋白表达;双荧光素酶报告基因实验明确 miR-9-5p 和 SIRT1 的靶向关系;Pearson 相关分析确定 miR-9-5p、SIRT1 及 Caspase-3 mRNA 表达的相互关系。结果 mimic 组 miR-9-5p mRNA 表达较对照组明显升高,结果有统计学意义,提示转染成功。与空白组及 NC 组相比,mimic 组 SIRT1 mRNA 及蛋白表达水平下调($P < 0.01$),p-NF- κ B p65 与 NF- κ B p65 上调($P < 0.01$),Caspase-3 mRNA 及蛋白表达水平上调($P < 0.01$)。双荧光素酶报告基因显示 miR-9-5p 可抑制野生型 SIRT1 细胞的荧光活性,miR-9-5p 可靶向调控 SIRT1 的表达;Pearson 相关分析发现 miR-9-5p 和 SIRT1 的表达水平呈负相关($r = -0.849, P < 0.05$);miR-9-5p 和 Caspase-3 的表达水平呈正相关($r = 0.796, P < 0.05$)。结论 过表达 miR-9-5p 可促进 PANC-1 细胞凋亡相关基因 Caspase-3 的表达,其机制可能与靶向调控 SIRT1 继而调节 NF- κ B 通路有关,这将为胰腺癌的诊断及治疗提供新的思路。

关键词:miR-9-5p;沉默调节蛋白 1;半胱氨酸蛋白酶-3;NF- κ B;胰腺肿瘤

中图分类号:R735.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-5817(2023)02-0195-07

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2023.02.005

Experimental study on miR-9-5p role in promoting apoptosis of pancreatic cancer cells through SIRT1/NF- κ B pathway

Li Xueqi^{1,2}, Zhou Qinghong^{1,2}, Pan Chunfeng^{1,2}, Wang Yuyang^{1,2},
Su Shixiang^{1,2}, Cen Lanying^{1,2}, Pan Lujian¹, Qin Yueqiu¹

(1. The Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities,
Baise 533000, Guangxi, China; 2. Graduate School, Youjiang Medical
University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of miR-9-5p on the expression of apoptosis-related gene Caspase-3 in pancreatic cancer cells (PANC-1) by regulating the expression of SIRT1 and NF- κ B. **Methods** Human pancreatic cancer cells (PANC-1) were transfected with miR-9-5p mimic lentivirus to establish stable

基金项目:国家自然科学基金项目(82260134);右江民族医学院附属医院高层次人才科研项目(R202011702)

第一作者简介:李雪颀(1995-),女,在读硕士研究生,研究方向:胰腺疾病基础与临床研究, E-mail:yujichuhan@163.com

通讯作者简介:覃月秋(1976-),女,博士,教授,博士、硕士研究生导师,研究方向:胰腺疾病发病机制及诊治, E-mail:gxbqyq@

transfected cells as mimic group, while empty vectors were transfected as negative control group (NC group), and untreated PANC-1 cells were used as blank control group (blank group). qRT-PCR was used to detect the expression levels of miR-9-5p, SIRT1 and Caspase-3 mRNA in PANC-1 cells; Western Blot was used to detect the protein expressions of SIRT1, NF- κ B pathway related proteins and Caspase-3 in each group; ELISA was used to detect the protein expressions of SIRT1 and Caspase-3 in cell lysate; Dual luciferase reporter gene assay was performed to confirm the targeted relationship between miR-9-5p and SIRT1; Pearson correlation analysis was used to determine the correlation among the expressions of miR-9-5p, SIRT1 and Caspase-3 mRNA. **Results** The expression of miR-9-5p mRNA in the mimic group was significantly higher than that in the control group, and the results had statistical differences, indicating the success of transfection ($P < 0.05$). Compared with the blank group and NC group, the expression levels of SIRT1 mRNA and protein in the mimic group were down-regulated ($P < 0.01$), p-NF- κ B p65 and NF- κ B p65 were up-regulated ($P < 0.01$), The expression levels of Caspase-3 mRNA and protein were up-regulated ($P < 0.01$). Dual luciferase reporter gene assay showed that miR-9-5p could inhibit the fluorescence activity of wild-type SIRT1 cells, and miR-9-5p could make target regulation of the expression of SIRT1; Pearson correlation analysis found the expression levels of miR-9-5p were negatively correlated with those of SIRT1 ($r = -0.849$, $P < 0.05$); The expression levels of miR-9-5p were positively correlated with those of Caspase-3 ($r = 0.796$, $P < 0.05$). **Conclusion** Overexpression of miR-9-5p can promote the expression of the apoptosis-related gene Caspase-3 in PANC-1 cells, and its mechanism may be related to the regulation of NF- κ B pathway by making target regulation of SIRT1, which will provide a new direction for the diagnosis and treatment of pancreatic cancer.

Key words: miR-9-5p; sirtuin 1; Caspase-3; NF- κ B; pancreatic cancer

胰腺癌是一种死亡率极高的恶性肿瘤,因其早期诊断率低,确诊常常已延误最佳治疗时机、预后不良^[1]。最常见的胰腺癌类型是胰导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC),其往往由胰腺上皮内瘤变(PanINs)和导管内乳头状黏液性肿瘤(IPMN)的增生性病变等癌前病变演化而来^[2]。近年来,全世界胰腺癌的发病率和死亡率都在逐年增加,尽管诊断和治疗手段都有了新的发展,但确诊后五年生存率却仅为 5%,约 80% 的患者无法接受外科治疗。即便进行了早期手术切除,术后五年生存率也仅为 15%~25%^[3]。胰腺癌的预后情况差,一方面与早期诊断率低有关,另一方面,胰腺癌细胞对凋亡刺激的反应差,因此放疗、化疗及免疫疗法等常规治疗方案效果均不理想^[4]。

沉默调节蛋白 1(sirtuin 1, SIRT1)是一种烟酰胺腺嘌呤二核苷酸依赖性脱乙酰酶,是 sirtuins 蛋白家族中的一员,大小约为 80 kDa 左右,作为一种核酶, SIRT1 广泛存在于身体各器官的细胞中,因其对老化、自噬、凋亡、炎症等调节的作用突出而受到学术界广泛关注,亦被称为“长寿蛋白”^[5]。SIRT1 抑制凋亡的作用可以导致半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)的分裂^[6]。在关于胰腺癌相关的研究中, SIRT1 通常被认为可以通过调节癌细胞的凋亡等方式影响其耐药性^[7]。

miR-9-5p 在癌细胞相关的研究中被报道,可以通

过调控 NF- κ B 通路表达来调节细胞的生理活动^[8],在巨噬细胞中,miR-9-5p 通过抑制 SIRT1 来调节 NF- κ B 通路^[9]。然而,miR-9-5p 通过 SIRT1/NF- κ B 通路调节细胞凋亡的过程在胰腺癌中的作用机制少见报道。本研究探讨 miR-9-5p 调控 SIRT1 通过 NF- κ B 通路对 PDAC 细胞系 PANC-1 细胞凋亡的影响,这将为胰腺癌的诊断及治疗提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人胰腺癌 PANC-1 细胞购于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.1.2 主要试剂 DMEM 培养基购自武汉普诺赛生命科技有限公司;胎牛血清、DMEM 高糖培养基购自 Gibco 公司;青-链霉素、胰蛋白酶购自北京索莱宝科技有限公司;上海吉凯基因医学科技股份有限公司,构建 miR-9-5p 过表达慢病毒载体,并完成包装、滴度的测定(载体类型:GV 慢病毒载体系列,荧光标记:EGFP);质粒、嘌呤霉素均购于上海吉凯基因医学科技股份有限公司;qRT-PCR 引物、miRNA 第一链 cDNA 合成(茎环法)均购于生工生物工程(上海)股份有限公司;X-tremegene HP 购于上海罗氏制药公司;SYBR Master Mix 扩增试剂盒购自上海翊圣生物科技有限公司;opti-MEM、Trizol、mRNA 第一链 cDNA 试剂盒均购自美国赛默飞世尔科技公司;ELISA 试剂盒购于武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;双荧光素酶报

告基因试剂盒购于普洛麦格(北京)生物技术有限公司;蛋白酶抑制剂混合物、一抗稀释液、二抗稀释液、电泳缓冲液、转膜缓冲液、 $20 \times$ TBST、封闭液、彩虹 Marker 均购自上海碧云天生物技术有限公司;PAGE 凝胶快速制备试剂盒、Omni-EasyTM 速溶型蛋白上样缓冲液(变性,还原型, $5 \times$)、超敏 ECL 化学发光试剂盒均购自上海雅酶生物医药科技有限公司;SIRT1 抗体、NF- κ B p65 抗体、p-NF- κ B p65 抗体、Caspase-3 抗体、 β -actin 抗体购自英国 Abcam;兔抗鼠 IgG HRP 购自 Affinity;PVDF 膜购自美国 Millipore 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、转染及分组 PANC-1 细胞在 37°C 、 5% CO_2 条件下培养,使用 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基。将 PANC-1 细胞接种于 6 孔板,

当细胞生长至 $50\% \sim 60\%$ 融合度时,将慢病毒加入孔板中进行转染。分组如下:mimic 组,转染 miR-9-5p 过表达慢病毒;NC 组,转染空载体慢病毒;空白组,不转染慢病毒。转染 12 h 更换新鲜培养基,24 h 后开始表达绿色荧光,72 h 荧光表达最强,在荧光显微镜下观察慢病毒转染效率,最后用嘌呤霉素进行稳定转染细胞株的筛选。

1.2.2 qRT-PCR 转染 24 h 后用 Trizol 提取各组细胞 RNA,紫外分光光度计检测 RNA 浓度和纯度。使用赛默飞逆转录试剂盒合成 cDNA,以 β -actin 作为 miR-9-5p、SIRT1 和 NF- κ B p65 的内参,qRT-PCR 反应条件为:预变性 95°C 300 s,变性 95°C 10 s,退火/延伸 60°C 30 s,40 个循环。结果使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法来分析。实验重复 3 次,引物见表 1。

表 1 RT-qPCR 实验各基因引物序列

基因名称	上游(5'→3')	下游(5'→3')
miR-9-5p-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTAGCACTGGATACGACTCATA	
miR-9-5p	GCGCGTCTTTGGTTATCTAGCTAGTGCAGGGTCCGAGGTATT	
SIRT1	ATACCAGTATGTGCTGTGC	AGGACATCGAGGAACCTGATTA
NF- κ B p65	CTGCCGCTGTCCTTTCTCATC	ATGTCCTCTTTCTGCACCTTGTCAC
Caspase-3	GTGGAGGCCGACTTCTTGATGCTGGCACAAAGCGACTGGATGAAC	
β -actin	ATCATTGCTCCTCCTGAGCG	CAGCTCAGTAACAGTCCGCC

1.2.3 Western Blot 在各组细胞中加入含有 1% 蛋白酶抑制剂 PMSF 的 RIPA 裂解液冰上裂解 35 min,在 4°C 条件下, $12\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 离心 15 min,取上清置于 EP 管中,通过 BCA 试剂盒测定各组样品蛋白的浓度,加入 $5 \times$ 蛋白上样缓冲液,沸水煮沸 15 min,以 $30\ \mu\text{g}$ 蛋白浓度进行 PAGE 凝胶电泳,常规湿法转膜后, 5% 牛血清白蛋白封闭 2 h,分别用 $1:1\ 000$ 的鼠抗兔单克隆抗体 GAPDH、 $1:20\ 000$ 的鼠抗兔单克隆抗体 SIRT1、 $1:1\ 000$ 鼠抗兔的单克隆抗体 Caspase-3 的一抗 4°C 摇床孵育过夜,TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,IgG-HRP 标记的鼠抗兔二抗 4°C 摇床孵育 2 h,TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,后增强化学发光(ECL)显影。利用 ImageJ 软件进行灰度值分析,用 SIRT1、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、Caspase-3 蛋白条带与 GAPDH 灰度值的比值计算各自的相对表达量,计算 p-NF- κ B p65 与 NF- κ B p65 相对表达量的比值。

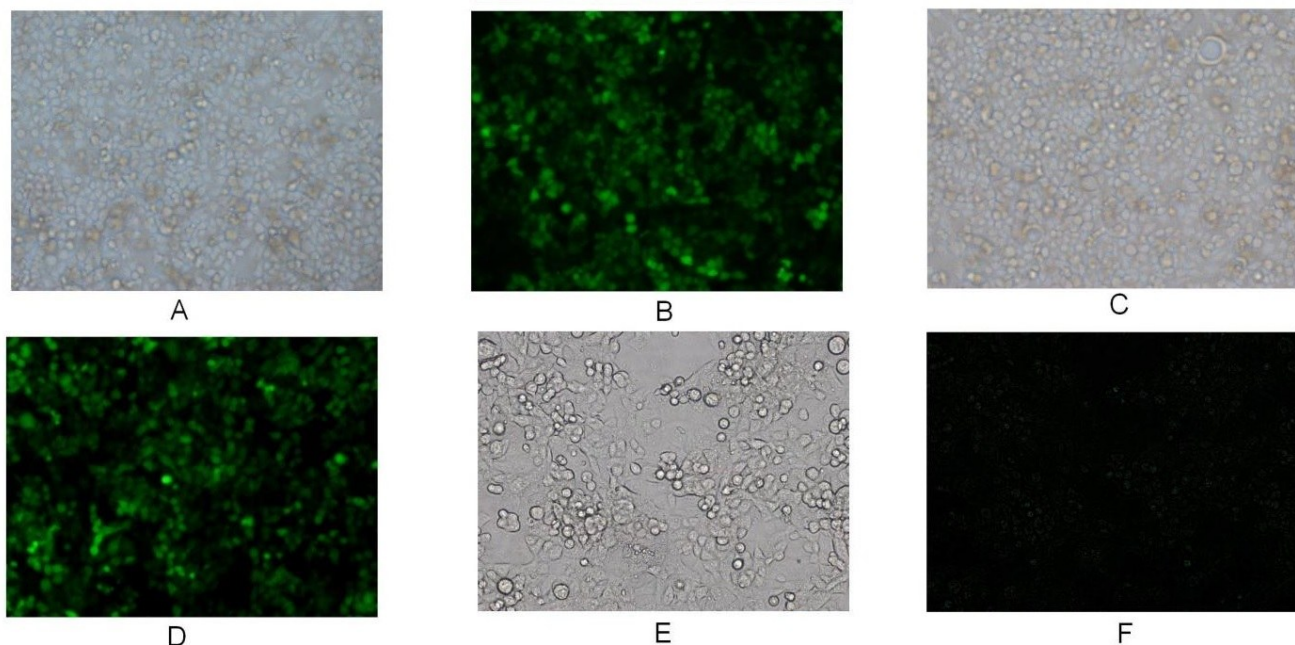
1.2.4 ELISA 将各组细胞在 T25 中培养至大约 70% 融合度时,用胰酶裂解后,离心收集细胞,PBS 洗涤 3 次后超声裂解细胞,随后反复冻融使细胞涨破,随后 4°C $1500 \times g$ 离心 10 min,收集上清,用 ELISA 法分别测量后进行分析,操作按试剂盒说明进行。

1.2.5 双荧光素酶报告基因实验 将构建的 SIRT1 3' UTR-WT(含 SIRT1 3' UTR 片段)和 SIRT1 3' UTR-MUT(含 SIRT1 3' UTR 片段突变体)的荧光素酶报告载体,采用 X-tremegene HP 分别将 SIRT1 3' UTR-WT 和 SIRT1 3' UTR-MUT 与 miR-9-5p mimic、miR-NC 共转染,转染后培养 48 h,按双荧光素酶报告基因检测试剂盒技术手册操作,记录萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶激发值,以两者的比值评价 SIRT1 基因的激活程度。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析,用 GraphPad Prism 8 作图。所有数据均进行正态分布和方差齐性检验,计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,两组间的比较采用两独立样本 t 检验,miR-9-5p、SIRT1、Caspase-3、NF- κ B p65 之间相关性采用 Pearson 相关性分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 慢病毒转染情况 培养 PANC-1 细胞至融合度为 50% 左右,开始慢病毒转染,转染条件为 $\text{MOI} = 10$ 时,转染 24 h 后,绿色荧光开始表达,72 h 绿色荧光表达最强,荧光显微镜下拍照,细胞表达较强的绿色荧光,细胞生长情况良好,如图 1 所示。

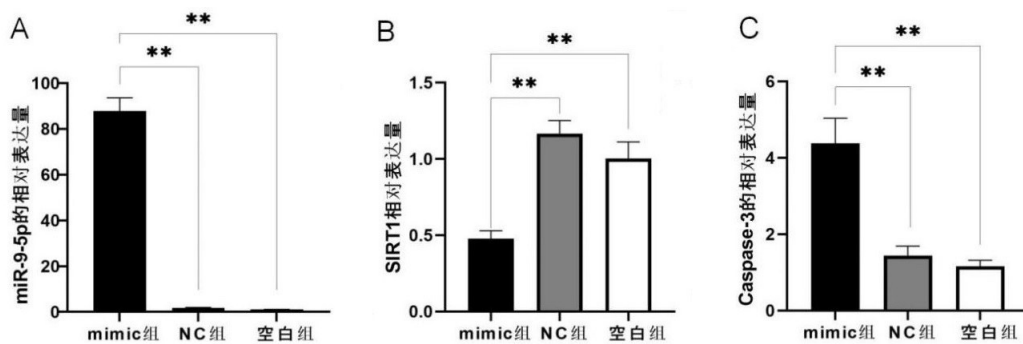


注:A、C、E分别为白光下mimic组、NC组和空白组的细胞形态;
B、D、F分别为GFP荧光下mimic组、NC组和空白组的细胞形态。

图1 细胞培养及转染效果(100×)

2.2 各组细胞 miR-9-5p、SIRT1、Caspase-3 mRNA 表达 qRT-PCR 检测结果显示(见图 2A~图 2C),与空白组及 NC 组相比,mimic 组 miR-9-5p 表达水平上

调($P < 0.01$),SIRT1 的表达水平下调($P < 0.01$),Caspase-3 表达水平上调($P < 0.01$)。



注:A.各组细胞 miR-9-5p 相对表达量;B.各组细胞 SIRT1 相对表达量;
C.各组细胞 Caspase-3 相对表达量。* $P < 0.01$ 。

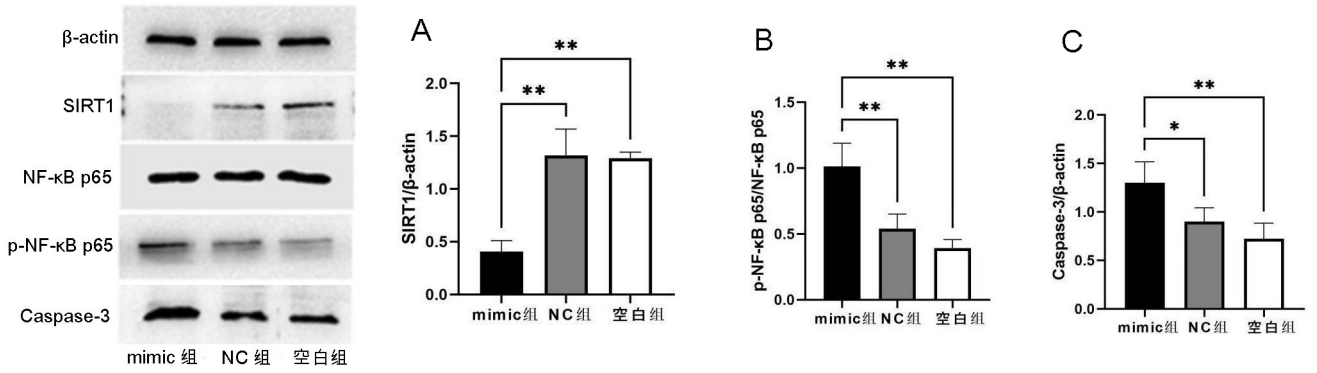
图2 各组细胞内 miR-9-5p、SIRT1、Caspase-3 mRNA 相对表达量

2.3 Western Blot 法检测 SIRT1、NF- κ B 通路相关蛋白、Caspase-3 蛋白的表达 Western Blot 实验结果显示(见图 3A~图 3C),与空白组及 NC 组相比,mimic 组 SIRT1 的蛋白表达量显著下调($P < 0.01$),p-NF- κ B p65 与 NF- κ B p65 蛋白表达比值显著上调($P < 0.01$),Caspase-3 蛋白表达量显著上调($P < 0.01$)。

2.4 ELISA 法检测各组细胞裂解液中 SIRT1 与 Caspase-3 蛋白的表达量 ELISA 法检测细胞裂解液结果显示(见图 4A、图 4B),与空白组及 NC 组相比,

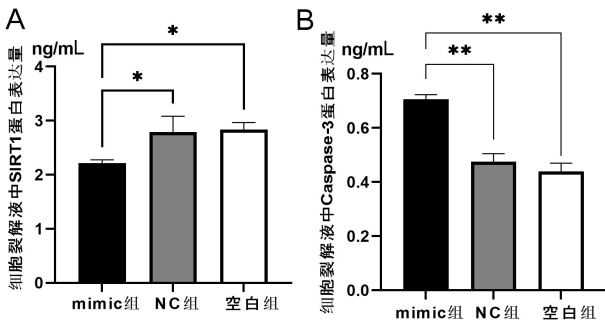
mimic 组 SIRT1 的蛋白表达量显著下调($P < 0.05$),Caspase-3 蛋白表达量显著上调($P < 0.01$)。

2.5 miR-9-5p、SIRT1、Caspase-3 mRNA 表达水平相关性分析 使用 Pearson 相关分析对 miR-9-5p、SIRT1、Caspase-3 的 mRNA 表达水平进行相关性分析发现(见图 5),miR-9-5p 与 SIRT1 的表达水平呈负相关($r = -0.849$, $P < 0.05$);miR-9-5p 与 Caspase-3 的表达水平呈正相关($r = 0.796$, $P < 0.05$)。



注:A. 各组细胞 SIRT1 蛋白表达量;B. 各组细胞 p-NF-κB p65 与 NF-κB p65 蛋白表达量比值;C. 各组细胞 Caspase-3 蛋白表达量。* $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 。

图 3 各组细胞 SIRT1、NF-κB p65、Caspase-3 蛋白表达量



注:A. 各组细胞裂解液中 SIRT1 蛋白表达量; B. 各组细胞裂解液中 Caspase-3 蛋白表达量。
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 4 各组细胞裂解液中 SIRT1、Caspase-3 蛋白表达量

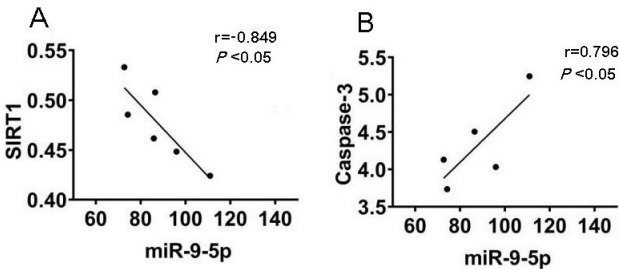
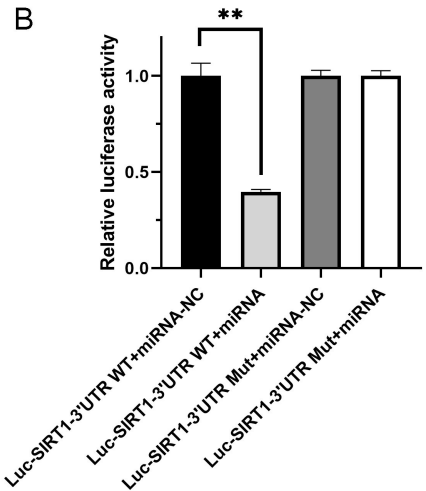
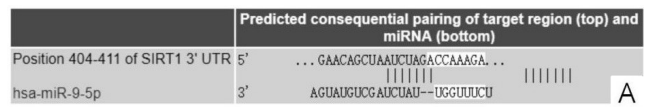


图 5 miR-9-5p、SIRT1、Caspase-3 mRNA 表达水平相关性分析

2.6 miR-9-5p 靶向 SIRT1 在 Target Scan Human 数据库预测 miR-9-5p 与 SIRT1 存在结合位点(见图 6A), 荧光素酶报告基因检测实验结果(见图 6B)显示转染野生型 SIRT1 基因表达载体 WT-SIRT1 后, 相较于 miR-NC 对照组, SIRT1 过表达组 AR42J 细胞的荧光素酶活性显著降低($P < 0.01$); 而转染突变型 SIRT1 基因表达载体 MUT-SIRT1 后, 相较于 miR-NC 对照组, miR-9-5p 过表达组 AR42J 细胞的荧光素酶活性差异不显著。可见, miR-9-5p 可靶向调控 SIRT1 的表达。



注:A. SIRT1 的 3'UTR 中含有与 miR-9-5p 互补的核苷酸序列;B. 双荧光素酶报告实验, ** $P < 0.01$ 。

图 6 miR-9-5p 靶向调控 SIRT1 的表达

3 讨论

胰腺癌因早期诊断难度大, 预后不良, 成为近年来死亡率极高的恶性肿瘤之一。目前, 有关于胰腺癌的相关机制仍然没有完全阐明。近年来许多研究发现, 细胞凋亡机制在胰腺癌的发生发展及预后方面都具有非常重要的作用。研究表明, 细胞凋亡过程在胰腺癌进程中被抑制^[10], 这是由于胰腺癌细胞的凋亡必须经过线粒体的增强作用, 但调节线粒体内信号的 Bcl-2 蛋白失衡, 使得信号转导偏向抗凋亡的方向。因此, 如何诱导细胞凋亡成为一种新的胰腺癌治疗方向, 并逐渐受到重视^[11]。

凋亡是一种细胞内在的自杀程序, 可能由内源性和外源性刺激触发。Caspase 是在其活性中心含有半胱氨酸的蛋白酶, 并且能够切割蛋白质, 其中 Caspase-

3,6 和 7 属于下游效应物,可以切割底物。基于 Caspase 在细胞死亡的执行阶段扮演重要的角色,将其称为细胞凋亡介质^[4]。许多关于胰腺癌细胞凋亡机制的研究都以 Caspase-3 作为凋亡标志物,在凋亡增加的情况下其表达上调^[12-14]。在本研究中,Caspase-3 表达水平上调,与前人的研究一致。

SIRT1 是一种 NAD⁺ 依赖乙酰脱乙酰酶,是 sirtuins 蛋白家族中的一员,作为一种核酶,SIRT1 广泛存在于身体各器官的细胞中,因其对老化、自噬、凋亡、炎症等调节的作用突出而受到学术界广泛关注,亦被称为“长寿蛋白”。SIRT1 可以调控多种信号通路,如 NF- κ B、PGC1 α 、FoxOs 等,而这些信号通路通常出现在与衰老相关的机制研究当中^[5]。SIRT1 抑制凋亡的作用可以导致 Caspase-3 的分裂^[6],ZHAO G 等^[15] 通过对胰腺癌细胞与癌旁细胞标本发现 SIRT1 在癌细胞中过表达,敲低 SIRT1 后,细胞凋亡增加。同样的,在 ZHAO G 等^[16] 的研究中,过表达 SIRT1 可以逆转多个胰腺癌细胞系的细胞衰老与凋亡趋势。上述研究说明 SIRT1 有抑制细胞凋亡的作用。在本研究中,mimic 组的 SIRT1 表达降低,同时 Caspase-3 表达上升,说明下调 SIRT1 表达可能使凋亡增加,这与前人的研究结果一致。

miRNA-9(miR-9)是一类广泛存在于生物体内的非编码 RNA。现有的对 miR-9 的研究认为,miR-9 在多种细胞中均可发挥多重功能。在肾上腺细胞中,重金属污染物诱导 miR-9-5p 上调,将会通过 PI3K/AKP 途径引起肾上腺细胞凋亡继而导致组织损伤^[17]。miR-9 对癌症发生发展的作用因其组织细胞的来源而异。在大部分癌症细胞中,miR-9 均呈低表达,并呈现一定的抑癌作用^[18-19]。CHEN X R 等^[20] 通过体内和体外实验证实,在神经胶质瘤细胞中,miR-9-5p 可以通过促进癌症细胞凋亡,增加其对抗癌药物替莫唑胺的敏感性。在胰腺癌中,miR-9-5p 低表达并被证实可以靶向 GOT1 抑制胰腺癌细胞的侵袭、增殖和谷氨酰胺代谢^[21]。在本研究中,与空白组相比,mimic 组在 miR-9-5p 上调的情况下,表现出细胞凋亡相关基因 Caspase-3 表达增加,这表示 miR-9-5p 诱导细胞凋亡的作用可能在胰腺癌细胞中发生。

在胰腺癌细胞凋亡的过程中,NF- κ B 通路发挥了十分重要的作用。NF- κ B 通路的激活通常分为两种通路:规范通路也称为经典通路,反应迅速且可逆,I κ B 被磷酸化从而失活,p50/p65 二聚体与 I κ B α 分离,穿过核膜进入细胞核,并与 DNA 结合^[22]。另一种途径称为非规范通路或替代通路,其依赖于 IKK α 二聚体激活 p52 与 RelB,与经典通路相比激活缓慢,且持续时间较长^[23]。在大多数胰腺癌患者中,组成 NF- κ B 的

RaI α 被激活,可以调控癌细胞的侵袭、生长、增殖、化学抗性^[5,24-25],而 SIRT1 作为一种去乙酰酶,可以靶向作用于 NF- κ B 蛋白,从而抑制其下游通路活性,诱发细胞凋亡^[26]。在本研究中,与空白组及 NC 组相比,mimic 组的 p-NF- κ B p65 蛋白与 NF- κ B p65 蛋白比值明显升高,提示通路被激活,同时凋亡相关基因 Caspase-3 表达增加,这与前人的研究一致。

目前,关于胰腺癌细胞凋亡的具体调控机制尚不清楚,miR-9-5p 是否靶向 SIRT1,调控 NF- κ B 通路影响胰腺癌细胞凋亡,少见相关文献报道。本研究通过生物信息分析发现 miR-9-5p 与 SIRT1 之间存在靶向结合位点,并通过文献查阅发现,miR-9-5p 通过靶向 SIRT1 诱导细胞凋亡的过程在帕金森病中已经被证实^[27],SIRT1 靶向 NF- κ B 通路引发细胞凋亡的过程亦在大鼠神经细胞里得到了佐证^[28]。本研究通过进一步荧光素酶报告实验发现,miR-9-5p 与 SIRT1 确实存在靶向关系。由此,本研究推断在胰腺癌细胞中,miR-9-5p 靶向 SIRT1/NF- κ B 这一通路可以调控 Caspase-3 的表达。为证实这一推测,本研究通过慢病毒转染建立 miR-9-5p 过表达 PANC-1 细胞,探讨这几项指标之间的相互关系。结果证实,mimic 组 miR-9-5p 过表达的同时,SIRT1 mRNA 及蛋白低表达,p-NF- κ B p65 蛋白与 NF- κ B p65 蛋白比值明显升高,Caspase-3 mRNA 及蛋白升高,提示这几者之间存在潜在关系。为明确 miR-9-5p 与 SIRT1 及凋亡相关基因 Caspase-3 表达的相互关系,我们进一步进行了 Pearson 相关分析,结果显示 miR-9-5p 与 SIRT1 表达呈负相关;miR-9-5p 与 Caspase-3 表达呈正相关。

综上,胰腺癌的发生发展过程与癌细胞的凋亡有关,SIRT1 作为去乙酰酶参与调控了胰腺癌细胞凋亡过程,且受到 miR-9-5p 的负调控。过表达 miR-9-5p 可能靶向 SIRT1/NF- κ B 通路,促进凋亡标志物 Caspase-3 的表达,这将为胰腺癌的诊断与治疗提供新的思路。

参考文献:

- [1] ANSARI D,TINGSTEDT B,ANDERSSON B,et al. Pancreatic cancer: yesterday, today and tomorrow[J]. Future Oncol,2016,12(16):1929-1946.
- [2] GRANT T J,HUA K,SINGH A. Molecular pathogenesis of pancreatic cancer[J]. Prog Mol Biol Transl Sci,2016,144:241-275.
- [3] KLEIN A P. Pancreatic cancer epidemiology: understanding the role of lifestyle and inherited risk factors[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol,2021,18(7):493-502.
- [4] SAMM N,WERNER K,RUCKERT F,et al. The role of apoptosis in the pathology of pancreatic cancer[J]. Canc-

- ers (Basel), 2010, 3(1):1-16.
- [5] CHEN C, ZHOU M, GE Y C, et al. SIRT1 and aging related signaling pathways [J]. *Mech Ageing Dev*, 2020, 187:111215.
- [6] ZHANG M, ZHANG Q, HU Y L, et al. miR-181a increases FoxO1 acetylation and promotes granulosa cell apoptosis via SIRT1 downregulation[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(10):e3088.
- [7] OON C E, STRELL C, YEONG K Y, et al. SIRT1 inhibition in pancreatic cancer models; contrasting effects *in vitro* and *in vivo*[J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 757:59-67.
- [8] POOS K, SMIDA J, NATHRATH M, et al. How microRNA and transcription factor co-regulatory networks affect osteosarcoma cell proliferation [J]. *PLoS Comput Biol*, 2013, 9(8):e1003210.
- [9] WANG J, MA S, YU J, et al. MiR-9-5p promotes M1 cell polarization in osteoarthritis progression by regulating NF- κ B and AMPK signaling pathways by targeting SIRT1 [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 101(Pt A):108207.
- [10] QIN J, WANG W S, AN F M, et al. PSMC2 is up-regulated in pancreatic cancer and promotes cancer cell proliferation and inhibits apoptosis [J]. *J Cancer*, 2019, 10(20):4939-4946.
- [11] OLECHOWSKA-JARZAB A, PTAK-BELOWSKA A, BRZOZOWSKI T. Therapeutic importance of apoptosis pathways in pancreatic cancer [J]. *Folia Med Cracov*, 2016, 56(1):61-70.
- [12] WANG C F, HUANG H G. Effects of ribosomal associated protein hnRNP D in gemcitabine-resistant pancreatic cancer [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 579:181-187.
- [13] XIE J M, WANG C F, YANG A Q, et al. Cucurmosin kills human pancreatic cancer SW-1990 cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2013, 13(6):952-956.
- [14] 于丰铭, 徐扬. Caspase-3 的研究进展 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2020, 42(11):2072-2078.
- [15] ZHAO G, CUI J, ZHANG J G, et al. SIRT1 RNAi knockdown induces apoptosis and senescence, inhibits invasion and enhances chemosensitivity in pancreatic cancer cells [J]. *Gene Ther*, 2011, 18(9):920-928.
- [16] ZHAO G, QIN Q, ZHANG J G, et al. Hypermethylation of HIC1 promoter and aberrant expression of HIC1/SIRT1 might contribute to the carcinogenesis of pancreatic cancer [J]. *Ann Surg Oncol*, 2013, 20 (Suppl 3):S301-S311.
- [17] QI X, REN Z H, CUI Y, et al. Cadmium induces apoptosis by miR-9-5p targeting PTEN and regulates the PI3K/AKT pathway in the piglet adrenal gland [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2022, 29(48):73001-73010.
- [18] 应曼曼, 张晓楠, 刘然, 等. miR-9-5P 靶向 CDH1、CTNNA1 和 ITGA6 对脉络膜黑色素瘤细胞功能的影响 [J]. *中国医科大学学报*, 2020, 49(10):893-898.
- [19] 万强. miRNA-9-5p 通过靶向调控 Notch2 对食管鳞癌细胞增殖、侵袭和迁移影响 [D]. 新乡: 新乡医学院, 2019.
- [20] CHEN X R, ZHANG Y G, WANG Q. miR-9-5p mediates ABCG1 to elevate the sensitivity of glioma cells to temozolomide [J]. *Front Oncol*, 2021, 11:661653.
- [21] WANG J, WANG B, REN H Q, et al. miR-9-5p inhibits pancreatic cancer cell proliferation, invasion and glutamine metabolism by targeting GOT1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 509(1):241-248.
- [22] CHOI M C, JO J, PARK J, et al. NF- κ B signaling pathways in osteoarthritic cartilage destruction [J]. *Cells*, 2019, 8(7):734.
- [23] SUN S C. The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17(9):545-558.
- [24] WANG L, ZHOU W, ZHONG Y F, et al. Overexpression of G protein-coupled receptor GPR87 promotes pancreatic cancer aggressiveness and activates NF- κ B signaling pathway [J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1):61.
- [25] WU T, YANG Q, CHEN M, et al. Role of an autophagy/lysosome pathway in NF- κ B pathway blocked pancreatic cancer Panc-1 cells [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2020, 13(3):437-446.
- [26] KATTO J, ENGEL N, ABBAS W, et al. Transcription factor NF κ B regulates the expression of the histone deacetylase SIRT1 [J]. *Clin Epigenetics*, 2013, 5(1):11.
- [27] WANG Z B, SUN L, JIA K X, et al. miR-9-5p modulates the progression of Parkinson's disease by targeting SIRT1 [J]. *Neurosci Lett*, 2019, 701:226-233.
- [28] GAO H L, YANG L S, SHAO Y S. SIRT1 / NF- κ B pathway on neuronal apoptosis in rats with ischemic stroke [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2022, 68(5):77-82.

收稿日期:2023-02-02;修回日期:2023-03-13