



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2022.03.006
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2022.03.006
Chinese Journal of General Surgery, 2022, 31(3):329-339.

· 基础研究 ·

长链非编码 RNA SOX21-AS1 调控 miR-31-5p/MMP-16 轴对胰腺癌细胞活性与增殖的影响

臧龙军, 陈东杰, 高文哲, 黄琿, 朱红伟, 余泉

(中南大学湘雅三医院 肝胆胰II外科, 湖南 长沙 410013)

摘要

背景与目的: 胰腺癌是一种常见的消化系统恶性肿瘤, 也是癌症死亡的常见病因。长链非编码 RNA (lncRNA) 已在多种恶性肿瘤中被鉴定为调节因子和特异度生物标志物。最新研究表明, lncRNA SOX21-AS1 在多种恶性肿瘤的发生、发展中起重要作用。但其在胰腺癌中的作用尚未明确。因此, 本研究探讨 SOX21-AS1 在胰腺癌中的表达及其功能。

方法: 用 qRT-PCR 检测 SOX21-AS1 在 20 对胰腺癌与邻近癌旁正常组织, 以及胰腺癌细胞系 (PANC-1、CAPAN2、CFPAC-1、BXPC3、SW1990) 与人胰管上皮细胞系 (HPDE) 中的表达。通过 GEPIA 数据库分析 SOX21-AS1 表达与胰腺癌患者预后的关系。采用 MTT 实验与集落形成实验分析 SOX21-AS1 沉默后胰腺癌细胞活力与增殖能力的变化。通过 DIANA 数据库预测 SOX21-AS1 的靶微小 RNA (miRNA) 及其下游的靶 mRNA, 随后进一步通过系列功能实验、双荧光素酶实验、拯救实验以及相关分析明确它们之间的关系。

结果: SOX21-AS1 在胰腺癌组织和细胞系中表达均上调, 其高表达患者预后差 (均 $P < 0.05$)。SOX21-AS1 沉默后, 胰腺癌细胞的活力与增殖能力均明显降低 (均 $P < 0.05$)。生物信息学分析显示, miR-31-5p 与 SOX21-AS1 及 MMP-16 mRNA 均存在靶向结合序列, 功能实验、荧光素酶实验及挽救实验结果均验证了三者之间的互作关系。此外, 相关性分析结果显示, SOX21-AS1 的表达与 miR-31-5p 的表达呈负相关 ($r^2 = 0.2571$, $P < 0.05$), miR-31-5p 的表达与 MMP-16 mRNA 的表达呈负相关 ($r^2 = 0.3113$, $P = 0.0106$)。

结论: SOX21-AS1 的表达上调与胰腺癌细胞活性、增殖能力增强及胰腺癌患者预后不良相关。机制上, SOX21-AS1 可能作为竞争性内源 RNA (ceRNA) 与 miR-31-5p 发生竞争性结合, 调节 MMP-16 的表达, 从而促进胰腺癌的进展。SOX21-AS1 可以作为胰腺癌的潜在预后生物标志物和诊治的靶点。

关键词

胰腺肿瘤; RNA, 长链非编码; 细胞增殖; ceRNA

中图分类号: R735.9

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81873589); 湖南省自然科学基金资助项目 (2020JJ5876); 湖南省长沙市科学技术局科技计划基金资助项目 (kq2004146)。

收稿日期: 2021-09-16; **修订日期:** 2022-02-20。

作者简介: 臧龙军, 中南大学湘雅三医院硕士研究生, 主要从事胰腺外科方面的研究。

通信作者: 余泉, Email: yuxiaoyx4@126.com

Effect of long non-coding RNA SOX21-AS1 on viability and proliferation of pancreatic cancer cells via modulating miR-31-5p/MMP-16 axis

ZANG Longjun, CHEN Dongjie, GAO Wenzhe, HUANG Hui, ZHU Hongwei, YU Xiao

(Department of Hepatopancreatobiliary Surgery II, the Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract

Background and Aims: Pancreatic cancer is a common tumor of the digestive system and a frequent cause of cancer-related death. Long non-coding RNAs (lncRNAs) have been demonstrated as regulators and specific biomarkers for multiple cancers. Recent evidence has indicated that the novel lncRNA SOX21-AS1 plays an important role in the initiation and progression of a variety of malignant tumors. However, its function in pancreatic cancer remains unclear. Therefore, this study was conducted to investigate the expression of SOX21-AS1 in pancreatic cancer and its function.

Methods: The expressions of SOX21-AS1 in 20 pairs of specimens of pancreatic cancer and adjacent normal tissue as well as in a range of pancreatic cancer cell lines (PANC-1, CAPAN2, CFPAC-1, BXPC3, and SW1990) and human pancreatic duct epithelial cell line (HPDE) were detected by qRT-PCR method. The relationship between SOX21-AS1 expression and the prognosis of pancreatic cancer patients were analyzed through GEPIA database. The changes in cell viability and proliferative capacity in pancreatic cancer cells after SOX21-AS1 silencing were determined by MTT assay and colony-forming assay. The targeted microRNAs (miRNAs) of SOX21-AS1 and its downstream targeted mRNAs were predicted using DIANA database, and then the interactions among them were validated by a series of function experiments, dual luciferase reporter assays, rescue experiments and correlation analyses.

Results: The expressions of SOX21-AS1 were upregulated in both pancreatic cancer tissue and cell lines, and the patients with its high expression had a poor prognosis (all $P < 0.05$). In pancreatic cancer cells after SOX21-AS1 silencing, the cell viability and proliferative ability were significantly decreased (both $P < 0.05$). Bioinformatics analysis indicated that there was a target binding sequence in miR-31-5p for both SOX21-AS1 and MMP-16 mRNA, and the interactions among them were confirmed by function experiments, dual luciferase reporter assays and rescue experiments. In addition, the results of correlation analysis showed that there was a negative correlation either between SOX21-AS1 expression and miR-31-5p expression ($r^2=0.2571$, $P < 0.05$), or between miR-31-5p expression and MMP-16 mRNA expression ($r^2=0.3113$, $P=0.0106$).

Conclusion: The increased expression of SOX21-AS1 is associated with the enhanced viability and proliferation of pancreatic cancer cells, as well as the poor prognosis of pancreatic cancer patients. In terms of mechanism, SOX21-AS1 may competitively bind to miR-31-5p as a competing endogenous RNA (ceRNA) to regulate the expression of MMP-16 mRNA, thereby promoting the progression of pancreatic cancer. SOX21-AS1 may probably be a potential biomarker and therapeutic target for pancreatic cancer.

Key words

Pancreatic Neoplasms; RNA, Long Noncoding; Cell proliferation; ceRNA

CLC number: R735.9

胰腺癌是一种恶性程度极高的消化系统肿瘤，是全球第 12 位常见恶性肿瘤^[1]，也是癌症死亡的

第七大原因；在我国，2003—2013 年居民癌症数据显示，胰腺癌发病率在所有恶性肿瘤中排第 10 位；

其中胰腺导管腺癌的病死率在所有恶性肿瘤中位列第5位,5年相对生存率在常见恶性肿瘤中最差,仅为7.2%,且呈逐年恶化的趋势^[2]。胰腺癌起病隐匿,早期诊断困难,发现后即处于局部进展期或远处转移期,可手术切除率低,超过80%患者会在手术切除后复发^[3],预后极差。而现阶段仍缺乏针对中晚期侵袭性胰腺癌的治疗手段,因此深入了解胰腺癌的分子病理学机制才能有助于开发高特异度、高效的靶向治疗药物^[4]。非编码RNA(non-coding RNA, ncRNA)是不进行编码蛋白质的功能性RNA,其中包括长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)、环状RNA(circular RNA, circRNA)、微小RNA(microRNA, miRNA)。lncRNA是一类长度超过200个核苷酸的非编码RNA,是肿瘤进展中重要的调节因子,参与了包括增殖、迁移、分化、凋亡等众多细胞事件。此外,它还参与各种细胞过程,并通过与miRNA、mRNA相互作用等多种机制参与恶性肿瘤的发生、发展进程^[5-8]。有研究报道lncRNA在胰腺癌发生、发展中发挥重要作用^[9],lncRNA LINC00261的上调能明显抑制胰腺癌在体内及体外的细胞增殖和迁移^[10],lncRNA TP73-AS1通过miRNA-128-3p/GOLM1轴促进胰腺癌细胞生长和转移^[11]。除此,对胰腺癌有影响的lncRNA还有BCAR4^[12]、RP11-567G11.1^[13]、CASC2^[14]。

SOX21-AS1是近年来新发现的一种位于人类13号染色体上长3 230 bp的lncRNA,为SOX21的反义基因,它与众多恶性肿瘤关系密切,研究表明SOX21-AS1影响肺腺癌侵袭和迁移^[15]及宫颈癌病程的进展^[16]。但目前SOX21-AS1在胰腺癌中的作用暂不明确。本研究旨在探索SOX21-AS1在胰腺癌病程发生发展中的相关作用及机制,以期对提高临床的诊治及改善预后发挥作用。

1 材料与方法

1.1 细胞系、细胞培养、转染与分组

5种胰腺癌细胞系(PANC-1、CAPAN2、CFPAC-1、BXPC3、SW1990)和人胰管上皮细胞系HPDE由美国典型培养物保藏中心提供。所有细胞都在RPMI1640培养基(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)中培养,培养基中添加10%胎牛血清(FBS, Thermo Fisher Scientific),在

37℃、5% CO₂加湿环境中培养。根据制造商的说明,使用Lipofectamine 2000试剂(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)进行瞬时转染。靶向SOX21-AS1的两种siRNA购自ABC(Abcam, Cambridge, MA, USA);miR-31-5p模拟物和miR-31-5p抑制剂购自Genechem(中国上海)。

1.2 实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)分析

通过TRIzol试剂(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)从组织或细胞中提取总RNA。用PARIS试剂盒(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)分离细胞核和细胞质来源的RNA。使用SYBR PCR试剂盒(德泰生物,中国南京)对SOX21-AS1和MMP-16 mRNA进行定量。使用NCode miRNA qRT-PCR分析评估miR-31-5p的表达水平。以GAPDH的表达水平为对照对SOX21-AS1的表达水平做标准化。将miR-31-5p的表达标准化为对照U6。本研究所使用的引物序列见表1。

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')
SOX21-AS1	
正向	CCGATGGGAAACCCCAATC
反向	AACGCTTGCTCAAGCCTCAT
GAPDH	
正向	GGTCCGAGTCAACGGATTTC
反向	GGAAGATGCTGATGGGATTTC
miR-31-5p	
正向	AGGCAAGATGCTGGCATAGCT
反向	CGTAGCAGCTTACTGTACTAC
MMP-16	
正向	TCACAGCGGATTTGGACAA
反向	AATCGGAATAGCGACGTTCT

1.3 细胞转染

miR-31-5p模拟物,miR-31-5p抑制物及其阴性对照购自RiboBio(中国广州)。为了抑制SOX21-AS1的表达,在U6/GFP/Neo质粒(GenePharma,中国上海)中构建了针对SOX21-AS1的siRNA序列(si-SOX21-AS1#1和si-SOX21-AS1#2),以携带非靶向序列的质粒被用作对照。使用Lipofectamine 2000试剂进行转染。转染后48 h,使用含有0.5 mg/mL G418的培养基(美国密苏里州圣路易斯的Sigma-Aldrich)选择稳定转染的细胞。本研究中使用的所有引物均来自Genechem(中国上海)。转染所使用的miRNA及siRNA序列见表2。

表2 miRNA与siRNA序列
Table 2 The miRNA and siRNA sequences

转染物	序列(5'-3')
miR-31-5p抑制物	CAGCUAUGCCAGCAUCUUGCCU
miR-31-5p模拟物	GAUCACUCGCAUCAUCAAGUAAU
miR-阴性对照(NC)	CAGCUAUGCCAGCAUCUUGCCU
anti-miR-NC	CCGUUUACCCUGGAACGUUGAU
si-SOX21-AS1#1	GCAUGAUUCUGUUUCCGUAAU
si-SOX21-AS1#2	GACUGUUCUAGCAAGAAAGU

1.4 双荧光素酶报告基因检测

使用 pmirGLO 荧光素酶表达载体 (Promega, 美国) 构建报告质粒。通过从 SOX21-AS1 插入包含预测的 miR-31-5p 结合位点的片段, 克隆了野生型 SOX21-AS1 (SOX21-AS1-WT) 质粒。通过使 miR-31-5p 的种子区域结合位点发生突变, 可以创建一个 SOX21-AS1 基因突变质粒 (SOX21-AS1-MT)。将 HEK293T 细胞铺在 6 孔板中, 并用含有 SOX21-AS1-WT 或 SOX21-AS1-MT 片段和 miR-31-5p 模拟物或阴性对照的荧光素酶报告载体共转染。通过从 miR-31-5p 插入包含预测的 MMP-16 结合位点的片段, 克隆了野生型 MMP-16 质粒 (MMP-16-WT)。通过使 miR-31-5p 的种子区域结合位点发生突变, 可以创建一个 MMP-16 基因突变质粒 (MMP-16-MT)。将 HEK293T 细胞铺在 6 孔板中, 并用含有 MMP-16-WT 或 MMP-16-MT 片段和 miR-31-5p 模拟物或阴性对照的荧光素酶报告载体共转染。48 h 后测定荧光素酶活性。

1.5 细胞活力测定

使用 MTT 法测定细胞增殖。将转染的 PANC-1 或 SW1990 细胞接种在 96 孔板中, 并在不同时间点 (接种后 1、2、3、4、5 d) 测量细胞增殖。简而言之, 将 MTT 溶液 (20 μ L, Sigma-Aldrich) 添加到细胞中 4 h, 除去培养基, 然后添加二甲基亚砜。使用 Quant Universal Microplate 分光光度计 (BioTek, Winooski, VT, 美国) 测定 490 nm 处的吸光度。

1.6 集落形成试验

转染后将细胞添加到 6 孔板 (500 个细胞/孔) 中。2 周后, 将细胞固定, 染色, 然后成像并使用光学显微镜计数。

1.7 统计学处理

实验数据以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 并使用 Student's *t* 检验和单向方差分析进行评估。

使用 GraphPad Prism 软件进行统计分析。所有检验均为双侧, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SOX21-AS1 在胰腺癌组织和细胞中的表达及对预后的影响

在使用 qRT-PCR 对 20 例胰腺癌患者的胰腺癌组织和匹配的邻近癌旁组织中的 SOX21-AS1 表达水平进行检测后, 结果显示, SOX21-AS1 在胰腺癌组织中表达明显高于癌旁组织 ($P < 0.01$) (图 1A)。此外, 实验结果还显示, 与癌旁组织 HPDE 相比, 胰腺癌细胞系 PANC-1、CAPAN2、CFPAC-1、BXPC3、SW1990 中 SOX21-AS1 表达均升高 (均 $P < 0.05$), 其中 SOX21-AS1 在 BXPC3、SW1990 细胞中的表达高于其他细胞株, 因此选用胰腺癌 BXPC3、SW1990 细胞为研究对象进行后续敲低实验 (图 1B)。通过 GEPIA 数据库检索发现, SOX21-AS1 高表达患者较其低表达患者预后差 ($P < 0.05$) (图 1C), 表明 SOX21-AS1 可能与胰腺癌病程发展的恶性程度密切相关。

2.2 沉默 SOX21-AS1 表达对胰腺癌细胞活力及增殖的影响

由于 SOX21-AS1 在胰腺癌组织和细胞中表达上调且与胰腺癌病程发展的恶性程度呈正相关, 进一步使用功能丧失实验来确定其是否影响胰腺癌细胞的细胞活力及增殖水平。在使用靶向 SOX21-AS1 的两种特定的 siRNA 转染 BXPC3、SW1990 细胞后, qRT-PCR 的结果发现, 与阴性对照组 (si-NC) 比较, BXPC3 和 SW1990 细胞中, si-SOX21-AS1#1 组与 si-SOX21-AS1#2 组中 SOX21-AS1 表达均降低 (均 $P < 0.05$) (图 2A), 表明转染后 SOX21-AS1 表达沉默, 提示转染成功 (且 si-SOX21-AS1#1 组中的沉默效果更明显, 故在后续实验中使用该组 siRNA 进行沉默)。随后, 通过 MTT 实验结果发现, BXPC3 和 SW1990 细胞中 si-SOX21-AS1#1 组的细胞活力均较各自 si-NC 组明显降低 (均 $P < 0.05$) (图 2B)。此外, 克隆形成实验结果发现, 在 BXPC3 和 SW1990 细胞中, si-SOX21-AS1#1 组细胞增殖水平相较于 si-NC 组明显下降 (均 $P < 0.05$) (图 2C)。这些数据表明, 沉默 SOX21-AS1 的表达降低了胰腺癌细胞的细胞活力和增殖水平。

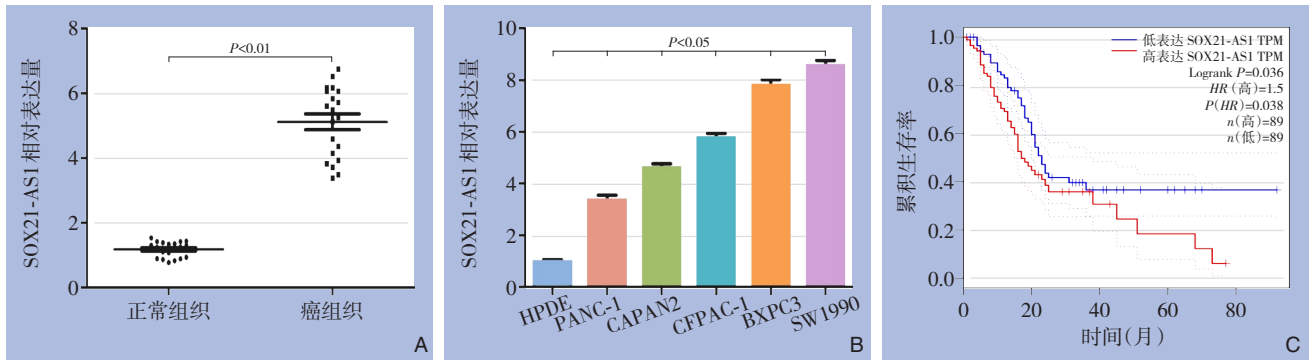


图1 胰腺癌中SOX21-AS1的表达及其对预后的影响 A: qRT-PCR检测20对胰腺癌标本和邻近正常组织中SOX21-AS1的表达量; B: qRT-PCR检测不同胰腺癌细胞系与正常胰腺导管上皮细胞中SOX21-AS1表达量; C: TCGA生物学数据库分析SOX21-AS1表达对胰腺癌患者预后的影响

Figure 1 Expression of SOX21-AS1 in pancreatic cancer and its association with the prognosis A: Relative expression of SOX21-AS1 detected by qRT-PCR in 20 cancer tissues and matched normal tissues; B: qRT-PCR analysis of the relative expression of SOX21-AS1 in pancreatic cell lines and normal pancreatic duct epithelial cell line; C: Influence of SOX21-AS1 on prognosis of pancreatic cancer patients by TCGA analysis

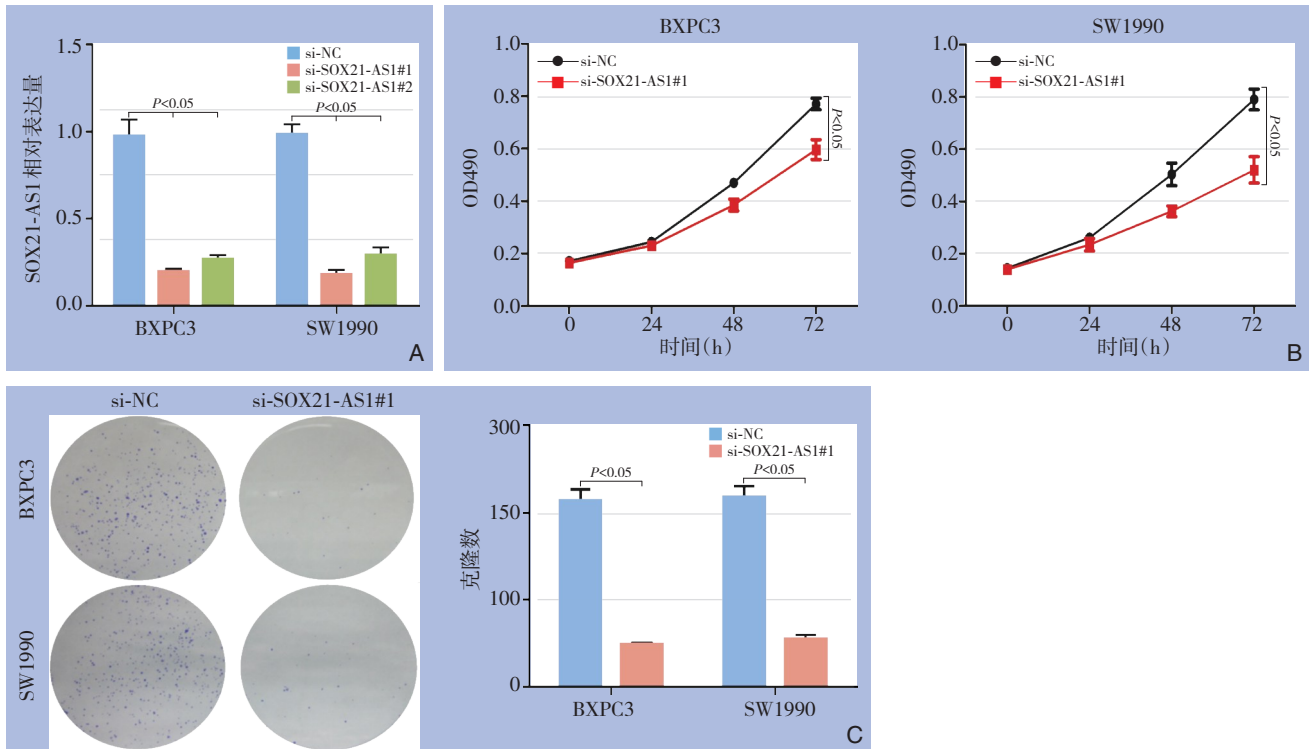


图2 SOX21-AS1对胰腺癌细胞活力、增殖的影响 A: qRT-PCR检测SOX21-AS1沉默后胰腺癌BXPC3、SW1990细胞中SOX21-AS1表达量; B: MTT检测BXPC3与SW1990细胞的活力; C: 细胞克隆实验检测BXPC3和SW1990细胞的增殖能力

Figure 2 Effect of SOX21-AS1 on viability and proliferation of pancreatic cancer cells A: The relative expression of SOX21-AS1 in BXPC3 and SW1990 cells after SOX21-AS1 silencing detected by qRT-PCR; B: Cell viabilities of HPDE and BXPC3 cells determined by MTT assay; C: The colony formations BXPC3 and SW1990 cells measured by colony-forming assay

2.3 SOX21-AS1的靶miRNA预测及验证

研究^[17]表明, 细胞质 lncRNA 最常见的机制是作为竞争性内源 RNA (ceRNA) 来结合各种 miRNA 以抑制其对目标 mRNA 的调节作用。为了确定 SOX21-AS1 是否可以作为 miRNA 的 ceRNA, 首先用 qRT-PCR 检测了细胞核和细胞质中 SOX21-AS1 的表达, 结果显示, SOX21-AS1 转录本大多存在于细胞质中 (图 3A)。此外, 通过 DIANA 数据库预测到 SOX21-AS1 与 miR-31-5p 存在靶向结合序列 (图 3B)。在 BXPC3、SW1990 细胞中, 转染 miR-31-5p 模拟物后, miR-31-5p 表达相比阴性对照组 (miR-NC) 明显升高 (均 $P<0.01$) (图 3C)。为了进一步证实 SOX21-AS1 与 miR-31-5p 存在相互作用, 将野生型 (SOX21-AS1-WT) 和突变型 (SOX21-AS1-MT) 结合 miR-31-5p 模拟物检测荧光素酶活性, 双荧光素酶报告结果显示, 在共转染 miR-31-5p 模拟物后, SOX21-AS1-WT 在 BXPC3 细胞中的相对荧光素酶活性明显降低, 而 SOX21-AS1-MT 的活性没有明显改变, 同样的, SOX21-AS1-WT 在 SW1990 细胞中的相对荧光素酶活性也明显减弱, 而 SOX21-AS1-MT 的荧光素酶活性没有明显改变 ($P<0.01$) (图 3D), 这不仅表明 miR-31-5p 是 SOX21-AS1 的直接靶标, 也能证明 miR-31-5p 与 SOX21-AS1 结合位点存在于突变载体附近。qRT-PCR 结果表明, 在 BXPC3 和 SW1990 细胞中, 沉默 SOX21-AS1 会导致 miR-31-5p 表达明显上调 ($P<0.005$) (图 3E); 与正常人胰腺组织相比, 人胰腺癌组织中 miR-31-5p 的表达明显降低 ($P<0.01$) (图 3F)。为了进一步验证 miR-31-5p 与 SOX21-AS1 的关系, 将 SOX21-AS1 与 miR-31-5p 行相关性分析, 结果也发现, SOX21-AS1 的表达与 miR-31-5p 呈负相关 ($r^2=0.2571$, $P<0.05$) (图 3G)。

为了进一步验证 SOX21-AS1 靶向调控 miR-31-5p 的表达, 进行了部分挽救实验, 结果发现, 在抑制 miR-31-5p 表达后, 与对照组 (si-NC) 比较, 挽救组 (si-SOX21-AS1+miR-31-5p inhibitor) 组胰腺癌 BXPC3、SW1990 细胞中 miR-

31-5p 表达均明显降低 (均 $P<0.01$) (图 4A), 提示该 miR-31-5p 抑制物有效。结果发现, 在沉默 SOX21-AS1 后, miR-31-5p 的表达明显上调, 而在加入 miR-31-5p 抑制剂后, miR-31-5p 的表达降低但仍明显高于 si-NC 组 ($P<0.05$) (图 4B); 同样地, 在沉默 SOX21-AS1 后, SOX21-AS1 的表达明显下调, 而在给予 miR-31-5p 抑制剂后, SOX21-AS1 的表达明显上调, 但仍低于 si-NC 组 ($P<0.01$) (图 4C)。此外, 在对 BXPC3 和 SW1990 进行细胞活力检测后发现, 与 si-NC 比较, si-SOX21-AS1#1 组中细胞活力明显下降, 在加入 miR-31-5p 抑制剂后出现明显好转 (均 $P<0.05$) (图 4D)。同时发现, 在 BXPC3、SW1990 细胞中, 与 si-NC 组比较, si-SOX21-AS1#1 组中细胞增殖能力明显减弱, 在加入 miR-31-5p 抑制剂后, 其增殖能力明显恢复 (均 $P<0.01$) (图 4E)。综上提示, SOX21-AS1 作为 miR-31-5p 的 ceRNA 在胰腺癌病程的发生发展中发挥作用。

2.4 miR-31-5p的靶mRNA分析及验证

为了进一步确定 SOX21-AS1 影响胰腺癌病程的机制, 在 DIANA 数据库预测了 miR-31-5p 靶位点, 发现 SOX21-AS1 和 MMP-16 mRNA 包含与 miR-31-5p 相同的结合位点 (图 5A)。为了证实 miR-31-5p 与 MMP-16 之间存在相互作用, 将 MMP-16-WT 与 MMP-16-MT (与 miR-31-5p 模拟物的结合位点突变序列) 克隆到双荧光素酶报告基因中, 结果发现 miR-31-5p 模拟物明显降低了 BXPC3 和 SW1990 中 MMP-16-WT 的细胞的荧光素酶活性 (均 $P<0.05$), 但在 MMP-16-MT 荧光素酶活性未见明显变化 (均 $P>0.05$) (图 5B)。此外, 在胰腺癌肿瘤组织中 MMP-16 的表达远高于正常胰腺上皮细胞的表达 ($P<0.01$) (图 5C), 同时, 在进行 miR-31-5p 与 MMP-16 相关性分析后发现 miR-31-5p 的表达与 MMP-16 呈负相关 ($r^2=0.3113$, $P=0.0106$) (图 5D)。以上结果表明, miR-31-5p 可能通过调节 MMP-16 参与胰腺癌病程的发生发展。

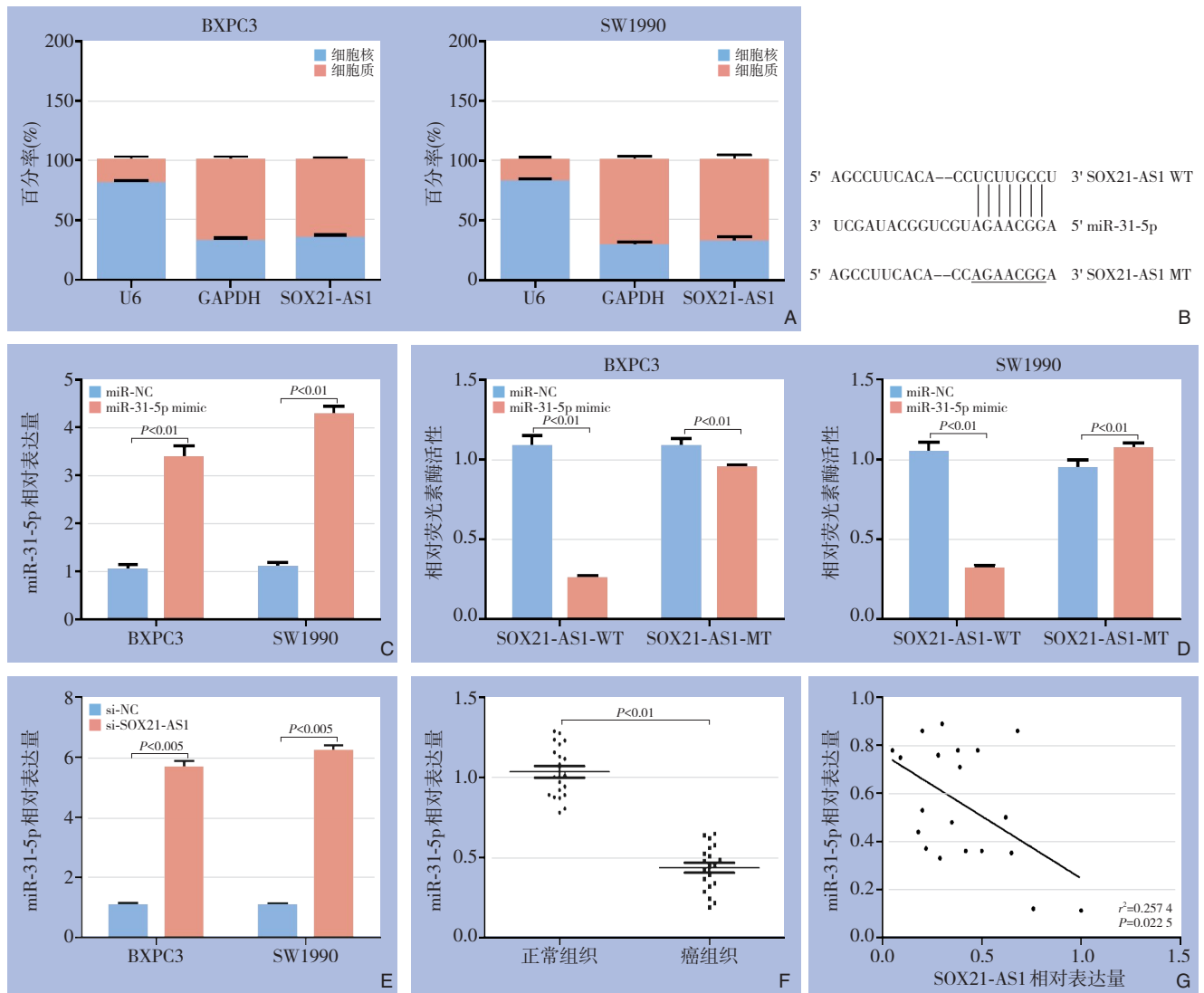


图3 SOX21-AS1 与 miR-31-5p 的关系分析 A: 核质分离实验检测 BXPC3 与 SW1990 中 SOX21-AS1 的分布情况; B: DIANA 预测 SOX21-AS1 与 miR-31-5p 中结合的靶向序列; C: qRT-PCR 分析在 BXPC3、SW1990 细胞中过表达 miR-31-5p 后 miR-31-5p 的表达量; D: 过表达 miR-31-5p 后, 转染 SOX21-AS1-WT 及 SOX21-AS1-MT 的 BXPC3 与 SW1990 细胞的双荧光素酶实验报告; E: qRT-PCR 检测干扰 SOX21-AS1 后 BXPC3、SW1990 中 miR-31-5p 的表达; F: qRT-PCR 检测 20 例胰腺癌及邻近正常组织中 miR-31-5p 的表达; G: SOX21-AS1 与 miR-31-5p 的相关性分析

Figure 3 Analysis of the relationship between SOX21-AS1 and miR-31-5p A: The distributions of SOX21-AS1 in BXPC3 and SW1990 cells examined by nuclear cytoplasmic fractionation assay; B: The targeted binding sequence of SOX21-AS1 with miR-31-5P predicted by DIANA; C: The expression levels of miR-31-5p in BXPC3 and SW1990 cells after miR-31-5p overexpression; D: Relative luciferase activities in BXPC3 and SW1990 cells with miR-31-5p overexpression after transfection with SOX21-AS1-WT and SOX21-AS1-MT; E: Relative expression of miR-106a-3p in BXPC3 and SW1990 cells after SOX21-AS1 interference determined by qRT-PCR; F: Relative expression levels of miR-31-5p in 20 pairs of pancreatic cancer and adjacent normal tissues detected by qRT-PCR; G: Correlation analysis between SOX21-AS1 and miR-31-5p expression

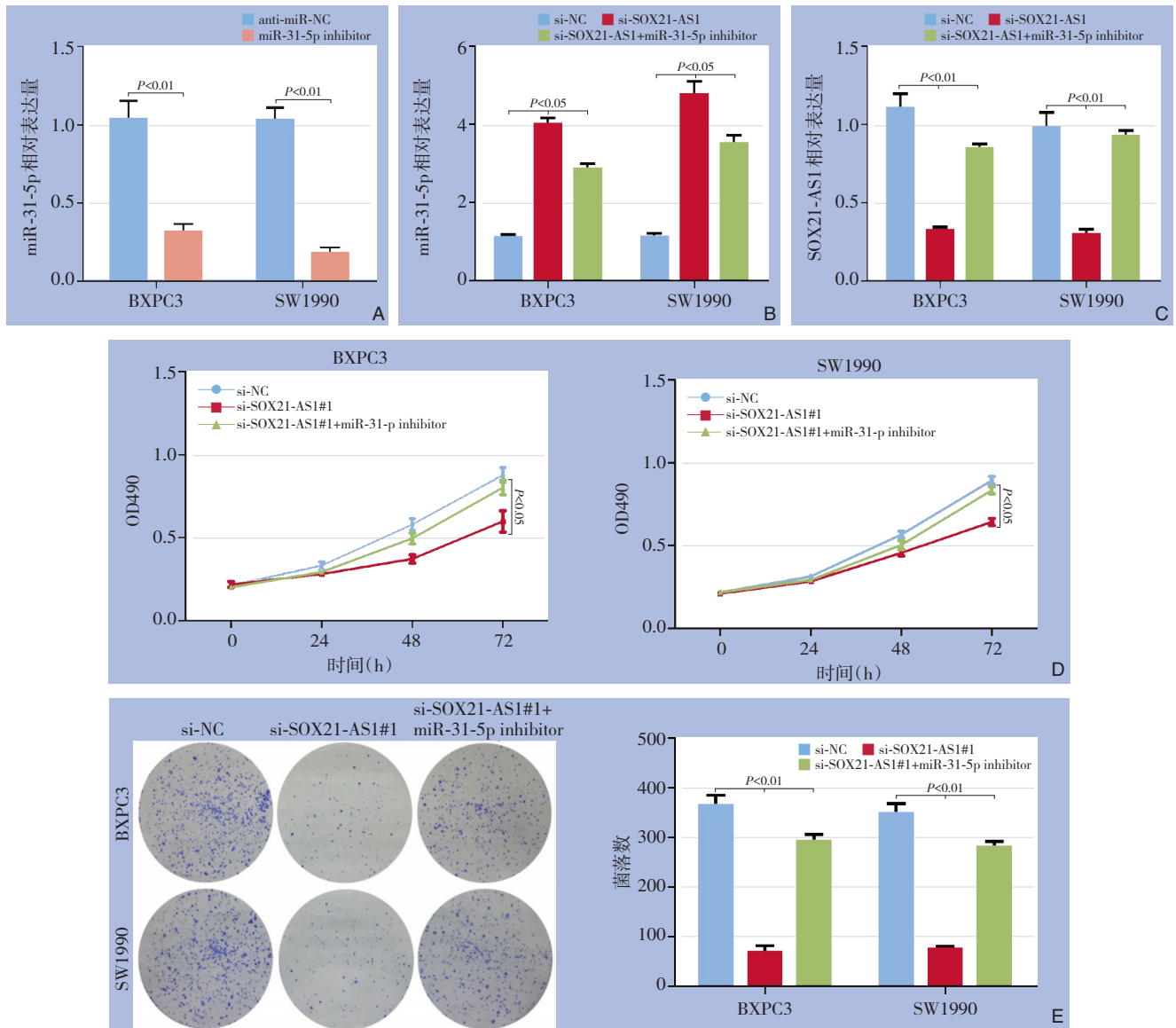


图4 SOX21-AS1靶向调控miR-31-5p表达的验证 A: qRT-PCR检测使用miR-31-5p抑制剂后BXPC3、SW1990细胞中miR-31-5p的表达量; B: qRT-PCR检测在BXPC3、SW1990细胞中,在si-SOX21-AS1质粒转染后加入miR-31-5p抑制剂后miR-31-5p的表达量; C: qRT-PCR检测在BXPC3、SW1990细胞系中,在si-SOX21-AS1质粒转染后加入miR-31-5p抑制剂后SOX21-AS1的表达量; D: MTT实验检测si-SOX21-AS1质粒转染后加入miR-31-5p抑制剂的BXPC3与SW1990细胞的细胞活力; E: 细胞克隆实验检测在BXPC3、SW1990细胞中,加入si-SOX21-AS1质粒转染和在此基础上加入miR-31-5p抑制剂的细胞增殖能力

Figure 4 Verification of targeted regulation of miR-31-5p expression by SOX21-AS1 A: The expression levels of miR-31-5p in BXPC3 and SW1990 cells transfected with miR-31-5p inhibitors detected by qRT-PCR; B: Relative expression levels of miR-31-5p in BXPC3 and SW1990 cells transfected with si-SOX21-AS1 plasmids after addition of miR-31-5p inhibitors detected by qRT-PCR; C: Relative expression levels of SOX21-AS1 in BXPC3 and SW1990 cells transfected with si-SOX21-AS1 plasmids after addition of miR-31-5p inhibitors detected by qRT-PCR; D: Cell viabilities of BXPC3 and SW1990 cells transfected with si-SOX21-AS1 plasmids after addition of miR-31-5p inhibitors detected by MTT assay; E: Proliferation abilities of BXPC3 and SW1990 cells after si-SOX21-AS1#1 transfection and miR-31-5p inhibitor addition detected by colony-forming assay

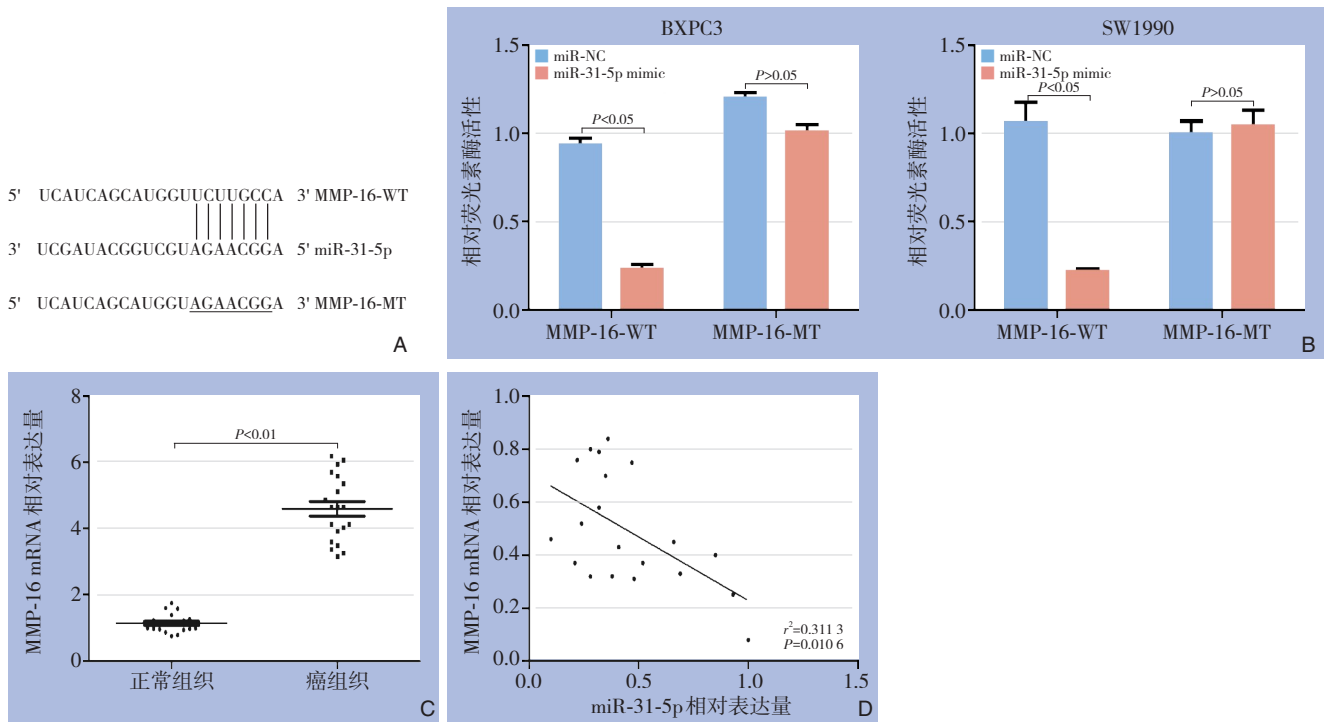


图5 miR-31-5p 靶向调节 MMP-16 A: DIANA 预测 MMP-16 与 miR-31-5p 中结合的靶向序列; B: 加入 miR-31-5p 模拟物后, 转染 MMP-16-WT 与 MMP-16-MT 的 BXPC3 细胞与 SW1990 细胞的双荧光素酶实验; C: qRT-PCR 检测 20 例胰腺癌及邻近正常组织中 MMP-16 的表达量; D: MMP-16 与 miR-31-5p 的相关性分析

Figure 5 Target regulation of MMP-16 expression by miR-31-5p A: The targeted binding sequence in miR-31-5P with MMP-16 predicted by DIANA; B: Relative luciferase activities in BXPC3 and SW1990 cells transfected with MMP-16-WT or MMP-16-MT after addition of miR-31-5p mimics; C: Relative expression levels of MMP-16 in 20 pairs of pancreatic cancer and adjacent normal tissues detected by qRT-PCR; D: Correlation analysis between MMP-16 and miR-31-5p expressions

3 讨论

本研究发现, 在胰腺癌组织和细胞系中 SOX21-AS1 水平升高, SOX21-AS1 的下调抑制了胰腺癌细胞的活力和增殖。此外, 还发现 SOX21-AS1 和 miR-31-5p 表达之间存在相互抑制, 这说明 SOX21-AS1 在胰腺癌细胞中存在通过 miR-31-5p 介导的促癌作用。本研究还证明了 SOX21-AS1 可通过抑制 miR-31-5p 来正向调节胰腺癌细胞中 MMP-16 的表达。

越来越多的证据表明, SOX21-AS1 在多种类型的肿瘤中均起着肿瘤启动子的作用。例如, 在结肠直肠癌患者中观察到 SOX21-AS1 的显著高表达, 而过表达的 SOX21-AS1 通过影响 miR-145/MY06 促进结肠直肠癌的发生进展^[18]。SOX21-AS1 在肝细胞癌^[19], 胃癌^[20], 三阴性乳腺癌^[21]和骨肉瘤^[22]中也上调。与这些报道一致, 本研究观察到胰腺癌组织和细胞系中的 SOX21-AS1 水平分别高于正常组织和 HPDE6 细胞, 这表明 SOX21-AS1 可能是胰腺癌中

的促癌基因。

lncRNA 可作为 ceRNA 发挥作用, 从而消除了 miRNA 对它们的目标转录本的内源性抑制作用。通过核质分离试验及 qRT-PCR 检测, 笔者猜测 SOX21-AS1 可能在胰腺癌中通过 ceRNA 方式起作用。为了解 SOX21-AS1 在胰腺癌中影响的潜在机制, 生物信息学分析结果表明, SOX21-AS1 中存在 miR-31-5p 的靶向序列, 并已观察到 miR-31-5p 在致癌作用中起抑癌基因的作用。先前的研究^[23]表明, miR-31-5p 通过靶向细胞周期蛋白依赖性激酶 1 (CDK1), 从而作为肾细胞癌的肿瘤抑制因子。在膀胱癌^[24], 鼻咽癌^[25], 胃癌^[26]和肝细胞癌中^[27], miR-31-5p 表达也降低。同样, 本研究也确定在胰腺癌组织和细胞系中 miR-31-5p 减少。此外, 本研究还发现 SOX21-AS1 的下调显著提高了 miR-31-5p 的水平, 而在用 miR-31-5p 模拟物转染的胰腺癌细胞中, SOX21-AS1 的水平却降低了; SOX21-AS1 和 miR-31-5p 之间的互补对结合, 并且进一步证明

SOX21-AS1与胰腺癌组织中的miR-31-5p呈负相关。这些发现表明，SOX21-AS1和miR-31-5p可能会形成相互抑制的反馈回路。

本研究探讨了miR-31-5p是否会影响SOX21-AS1在胰腺癌细胞中的作用，结果揭示miR-31-5p抑制剂可以挽救SOX21-AS1的下调对胰腺癌细胞生存能力和侵袭的抑制作用。SOX21-AS1的下调通过调节miR-31-5p抑制了胰腺癌细胞的活力和侵袭力。但是，当前的研究不能排除SOX21-AS1也可能影响胰腺癌中其他miRNA或相关基因的可能性，这需要进一步的研究。同时，在线生物信息学数据库分析中，预测SOX21-AS1和MMP-16包含与miR-31-5p相同的结合位点。Zhang等^[28]报道，miR-155通过靶向SOCS1和MMP-16促进乳腺癌细胞增殖和迁移。因此推测SOX21-AS1可能起抑制miR-31-5p的作用，从而正向调节MMP-16的表达。据相关文献报道，MMP-16能诱导肝癌^[29]、胃癌^[30]等多种恶性肿瘤的增殖与转移，而目前鲜有报道其在胰腺癌中的相关作用。本研究初步证明了SOX21-AS1能够通过抑制miR-31-5p正向调节MMP-16表达，继而增强胰腺癌细胞的增殖活力，这给未来MMP-16在胰腺癌中的研究提供了新的思路。

总之，胰腺癌组织和细胞系中的SOX21-AS1水平显著降低，SOX21-AS1表达的下调通过miR-31-5p水平的上调降低了细胞活力和侵袭。这些结果表明，SOX21-AS1是预测预后的关键分子标志物，并且有望成为胰腺癌治疗中的重要靶标。

利益冲突：所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer statistics, 2021[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(1):7-33. doi: 10.3322/caac.21654.
- [2] Zeng HM, Chen WQ, Zheng RS, et al. Changing cancer survival in China during 2003-15: a pooled analysis of 17 population-based cancer registries[J]. *Lancet Glob Health*, 2018, 6(5):e555-567. doi: 10.1016/S2214-109X(18)30127-X.
- [3] 刘江, 吉顺荣, 徐近, 等. 临界可切除胰腺癌的诊疗策略[J]. *中国普通外科杂志*, 2017, 26(9):1089-1092. doi: 10.3978/j.issn.1005-6947.2017.09.002.
- [4] Liu J, Ji SR, Xu J, et al. Diagnosis and treatment strategies for borderline resectable pancreatic cancer[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2017, 26(9):1089-1092. doi: 10.3978/j.issn.1005-6947.2017.09.002.
- [5] Zou JF, Wang E. Cancer biomarker discovery for precision medicine: new progress[J]. *Curr Med Chem*, 2019, 26(42):7655-7671. doi: 10.2174/0929867325666180718164712.
- [6] Panda AC, Abdelmohsen K, Gorospe M. SASP regulation by noncoding RNA[J]. *Mech Ageing Dev*, 2017, 168:37-43. doi: 10.1016/j.mad.2017.05.004.
- [7] 帅勇锋, 占大钱, 王小军, 等. LncRNA SNHG15在甲状腺癌细胞中的表达及作用[J]. *中国普通外科杂志*, 2016, 25(11):1590-1595. doi: 10.3978/j.issn.1005-6947.2016.11.012.
- [8] Shuai YF, Zhan DQ, Wang XJ, et al. Expression and action of LncRNA SNHG15 in thyroid cancer cells[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2016, 25(11):1590-1595. doi: 10.3978/j.issn.1005-6947.2016.11.012.
- [9] Peng WX, Koirala P, Mo YY. LncRNA-mediated regulation of cell signaling in cancer[J]. *Oncogene*, 2017, 36(41):5661-5667. doi: 10.1038/ncr.2017.184.
- [10] Zhang XP, Wang W, Zhu WD, et al. Mechanisms and functions of long non-coding RNAs at multiple regulatory levels[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(22):5573. doi: 10.3390/ijms20225573.
- [11] Zhang MG, Gao F, Yu X, et al. LINC00261: a burgeoning long noncoding RNA related to cancer[J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1):274. doi: 10.1186/s12935-021-01988-8.
- [12] Liu SS, Zheng Y, Zhang YJ, et al. Methylation-mediated LINC00261 suppresses pancreatic cancer progression by epigenetically inhibiting c-Myc transcription[J]. *Theranostics*, 2020, 10(23):10634-10651. doi: 10.7150/thno.44278.
- [13] Wang B, Sun X, Huang KJ, et al. Long non-coding RNA TP73-AS1 promotes pancreatic cancer growth and metastasis through miRNA-128-3p/GOLM1 axis[J]. *World J Gastroenterol*, 2021, 27(17):1993-2014. doi: 10.3748/wjg.v27.i17.1993.
- [14] 邢宏松, 江帆, 吴国俊, 等. 长链非编码RNA BCAR4对胰腺癌细胞增殖和凋亡的影响及机制[J]. *中国普通外科杂志*, 2018, 27(3):328-334. doi: 10.3978/j.issn.1005-6947.2018.03.010.
- [15] Xing HS, Jiang F, Wu GJ, et al. Effect of long non-coding RNA BCAR4 on proliferation and apoptosis of pancreatic carcinoma cells and the mechanism[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2018, 27(3):328-334. doi: 10.3978/j.issn.1005-6947.2018.03.010.
- [16] Huang RL, Nie WP, Yao K, et al. Depletion of the lncRNA RP11-567G11.1 inhibits pancreatic cancer progression[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 112:108685. doi: 10.1016/j.biopha.2019.108685.
- [17] Zhang H, Feng XL, Zhang MY, et al. Long non-coding RNA CASC2 upregulates PTEN to suppress pancreatic carcinoma cell metastasis by downregulating miR-21[J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19:18. doi: 10.1186/s12935-019-0728-y.

- [15] Xu Y, Wu HW, Wu L, et al. Silencing of long non-coding RNA SOX21-AS1 inhibits lung adenocarcinoma invasion and migration by impairing TSPAN8 via transcription factor GATA6[J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 164: 1294–1303. doi: [10.1016/j.ijbiomac.2020.07.172](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.172).
- [16] Zhang XY, Zhao XL, Li Y, et al. Long noncoding RNA SOX21-AS1 promotes cervical cancer progression by competitively sponging miR-7/VDAC1[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10): 17494–17504. doi: [10.1002/jcp.28371](https://doi.org/10.1002/jcp.28371).
- [17] Schmitt AM, Chang HY. Long noncoding RNAs in cancer pathways[J]. *Cancer Cell*, 2016, 29(4): 452–463. doi: [10.1016/j.ccell.2016.03.010](https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.03.010).
- [18] Wei AW, Li LF. Long non-coding RNA SOX21-AS1 sponges miR-145 to promote the tumorigenesis of colorectal cancer by targeting MYO6[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 96: 953–959. doi: [10.1016/j.biopha.2017.11.145](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.145).
- [19] Wei CX, Wang H, Xu F, et al. LncRNA SOX21-AS1 is associated with progression of hepatocellular carcinoma and predicts prognosis through epigenetically silencing p21[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 104: 137–144. doi: [10.1016/j.biopha.2018.05.010](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.010).
- [20] Jiang YY, Zhang XQ, Rong L, et al. Integrative analysis of the gastric cancer long non-coding RNA-associated competing endogenous RNA network[J]. *Oncol Lett*, 2021, 21(6): 456. doi: [10.3892/ol.2021.12717](https://doi.org/10.3892/ol.2021.12717).
- [21] Liu X, Song JY, Kang Y, et al. Long noncoding RNA SOX21-AS1 regulates the progression of triple-negative breast cancer through regulation of miR-520a-5p/ORMDL3 axis[J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121(11): 4601–4611. doi: [10.1002/jcb.29674](https://doi.org/10.1002/jcb.29674).
- [22] Chen HP, Chen J. LncRNA SOX21-AS1 promotes the growth and invasiveness of osteosarcoma cells through miR-7-5p/IRS2 regulatory network[J]. *Arch Med Res*, 2021, 52(3): 294–303. doi: [10.1016/j.arcmed.2020.11.007](https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.11.007).
- [23] Li YW, Quan J, Chen FF, et al. miR-31-5p acts as a tumor suppressor in renal cell carcinoma by targeting cyclin-dependent kinase 1 (CDK1)[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 111: 517–526. doi: [10.1016/j.biopha.2018.12.102](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.102).
- [24] Bi JM, Liu HW, Cai ZJ, et al. Circ-BPTF promotes bladder cancer progression and recurrence through the miR-31-5p/RAB27A axis[J]. *Aging*, 2018, 10(8): 1964–1976. doi: [10.18632/aging.101520](https://doi.org/10.18632/aging.101520).
- [25] Yi SJ, Liu P, Chen BL, et al. Circulating miR-31-5p may be a potential diagnostic biomarker in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Neoplasma*, 2019, 66(5): 825–829. doi: [10.4149/neo_2018_181109N847](https://doi.org/10.4149/neo_2018_181109N847).
- [26] Wei J, Wang ZJ, Wang ZX, et al. microRNA-31 function as a suppressor was regulated by epigenetic mechanisms in gastric cancer[J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 5348490. doi: [10.1155/2017/5348490](https://doi.org/10.1155/2017/5348490).
- [27] Zhao GL, Han CY, Zhang Z, et al. Increased expression of microRNA-31-5p inhibits cell proliferation, migration, and invasion via regulating Sp1 transcription factor in HepG2 hepatocellular carcinoma cell line[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 490(2): 371–377. doi: [10.1016/j.bbrc.2017.06.050](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.06.050).
- [28] Zhang W, Chen CJ, Guo GL. miR-155 promotes the proliferation and migration of breast cancer cells via targeting SOCS1 and MMP16[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(21): 7323–7332. doi: [10.26355/eurev_201811_16269](https://doi.org/10.26355/eurev_201811_16269).
- [29] Shen ZH, Wang X, Yu XT, et al. MMP16 promotes tumor metastasis and indicates poor prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(42): 72197–72204. doi: [10.18632/oncotarget.20060](https://doi.org/10.18632/oncotarget.20060).
- [30] Cao L, Chen CW, Zhu HH, et al. MMP16 is a marker of poor prognosis in gastric cancer promoting proliferation and invasion[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(32): 51865–51874. doi: [10.18632/oncotarget.10177](https://doi.org/10.18632/oncotarget.10177).

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 臧龙军, 陈东杰, 高文哲, 等. 长链非编码 RNA SOX21-AS1 调控 miR-31-5p/MMP-16 轴对胰腺癌细胞活性与增殖的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2022, 31(3): 329–339. doi: [10.7659/j.issn.1005-6947.2022.03.006](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2022.03.006)

Cite this article as: Zang LJ, Chen DJ, Gao WZ, et al. Effect of long non-coding RNA SOX21-AS1 on viability and proliferation of pancreatic cancer cells via modulating miR-31-5p/MMP-16 axis[J]. *Chin J Gen Surg*, 2022, 31(3): 329–339. doi: [10.7659/j.issn.1005-6947.2022.03.006](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2022.03.006)