

• 基础研究 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2024.18.001

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20240715.1904.013\(2024-07-17\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20240715.1904.013(2024-07-17))

胰腺癌细胞中 CXXC4 表达水平变化对其增殖、凋亡的影响*

周 静¹,王璐瑶¹,崔笑妍¹,张亚楠¹,张荣花¹,王梅梅¹,熊亚南¹,刘志勇^{2,3},章广玲^{2,4△}

(1. 华北理工大学基础医学院河北省慢性疾病重点实验室,河北唐山 063210;2. 华北理工大学附属医院,河北唐山 063000;3. 华北理工大学医学部,河北唐山 063210;4. 华北理工大学临床医学院河北省医工融合精准医疗重点实验室,河北唐山 063015)

[摘要] 目的 探讨 CXXC 指蛋白 4(CXXC4)对胰腺癌细胞 PANC-1 增殖和凋亡的影响。方法 在线数据库分析胰腺癌组织中 CXXC4 的表达水平及其与患者预后和临床病理分期的关系。实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测人正常胰腺导管上皮细胞 HPNE 细胞及胰腺癌细胞 PANC-1、AsPC-1 和 BxPC-3 中 CXXC4 的 mRNA 表达。si-NC、si-CXXC4、pcDNA3.1 和 pcDNA3.1-CXXC4 分别转染 PANC-1 细胞,Western bolt 试验检测 CXXC4 敲降和过表达的有效性。CCK-8、集落形成、EdU 和免疫荧光实验分析敲降或过表达 CXXC4 对 PANC-1 细胞增殖和凋亡的影响。生物信息学网站预测 CXXC4 的上游 miRNA。Starbase 数据库分析 miR-450b-5p 与 CXXC4 在胰腺癌组织中表达相关性。结果 TCGA 数据库结果显示,与癌旁胰腺组织相比,胰腺癌组织中 CXXC4 低表达($P<0.001$),且与胰腺癌患者总体生存期和预后不良有关($P<0.05$)。GEPIA 数据库分析结果显示,与 I 期胰腺癌相比,II 期胰腺癌中 CXXC4 表达降低(均 $P<0.05$)。与 HPNE 细胞相比,在 3 种胰腺癌细胞中 CXXC4 表达降低($P<0.05$)。与 si-NC 组相比,si-CXXC4 组 PANC-1 细胞增殖和集落形成能力增强,增殖标志物 Ki67、增殖细胞核抗原(PCNA)表达升高,凋亡标志物 Bax、caspase-3 及 caspase-9 表达降低;与 pcDNA3.1 组相比,pcDNA3.1-CXXC4 组 PANC-1 细胞得到与上述相反的结果(均 $P<0.05$)。生物信息学网站预测 miR-450b-5p 为 CXXC4 的上游 miRNA,胰腺癌组织中 CXXC4 与 miR-450b-5p 的表达呈负相关($r=-0.227$),miR-450b-5p 在多种哺乳动物中物种保守较高。结论 CXXC4 抑制胰腺癌 PANC-1 细胞的增殖并促进其凋亡。

[关键词] CXXC 指蛋白 4;胰腺癌;PANC-1 细胞;增殖;凋亡

[中图法分类号] R735.9 [文献标识码] A [文章编号] 1671-8348(2024)18-2721-09

Effect of CXXC4 expression level change in pancreatic cancer cells on proliferation and apoptosis*

ZHOU Jing¹,WANG Luyao¹,CUI Xiaoyan¹,ZHANG Yanan¹,ZHANG Ronghua¹,WANG Meimei¹,XIONG Yanan¹,LIU Zhiyong^{2,3},ZHANG Guangling^{2,4△}

(1. Hebei Provincial Key Laboratory for Chronic Diseases, School of Basic Medical Sciences, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063210, China; 2. Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000, China; 3. Department of Medicine, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063210, China; 4. Hebei Provincial Key Laboratory of Precision Medicine for Medical and Industrial Integration, Clinical School of Medicine, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063015, China)

[Abstract] Objective To investigate the effect of CXXC finger protein 4 (CXXC4) on the proliferation and apoptosis of pancreatic cancer PANC-1 cells. Methods The expression level of CXXC4 in pancreatic cancer tissues and its relationship with prognosis and clinicopathological stage of the patients were analyzed in on-line databases. The qRT-PCR technique was used to detect the mRNA expression level of CXXC4 in human normal pancreatic ductal epithelial cell line (HPNE) and pancreatic cancer cell PANC-1, AsPC-1 and BxPC-3. si-NC, si-CXXC4, pcDNA3.1 and pCDNA3.1-CXXC4 were respectively transfected into PANC-1 cells. West-

* 基金项目:河北省自然科学基金项目(H2023209047/H2021209026);河北省人力资源和社会保障厅项目(C20210340);河北省重点研发计划项目(213777115D);河北省财政厅项目(冀财预复[2020]397号)。△ 通信作者,E-mail:zhanggl@ncst.edu.cn。

ern blot was conducted to detect the effectiveness of CXXC4 knockdown and overexpression. CCK-8, colony formation, EdU and immunofluorescence assays were conducted to analyze the effect of CXXC4 knockdown or overexpression on the proliferation and apoptosis of PANC-1 cells. The bioinformatic websites was used to predict the upstream microRNA (miRNA) of CXXC4. The Starbase database was adopted to analyze the correlation between miR-450b-5p and CXXC4 expression in pancreatic cancer tissues. **Results** The TCGA database results showed that the expression of CXXC4 in pancreatic cancer tissues was lowly expressed compared with in paracancerous pancreatic tissues ($P<0.001$), moreover which was associated with the overall survival and poor prognosis in the patients with pancreatic cancer ($P<0.05$). The GEPIA database analysis results showed that compared with stage I pancreatic cancer, the CXXC4 expression in stage II pancreatic cancer was decreased ($P<0.05$). Compared with HPNE cells, the CXXC4 expression in 3 kinds of pancreatic cancer cells was decreased ($P<0.05$). Compared with the si-NC group, the proliferation and colony formation ability of PANC-1 cells in the si-CXXC4 group were enhanced, the expressions of proliferation markers Ki67 and PCNA were increased, and the expressions of apoptosis markers Bax, caspase-3 and caspase-9 were decreased; compared with the pcDNA3.1 group, the PANC-1 cells in the pcDNA3.1-CXXC4 group obtained the opposite results (all $P<0.05$). The bioinformatic websites predicted that miR-450b-5p was the upstream miRNA of CXXC4, CXXC4 in pancreatic cancer tissues was negatively correlated with the miR-450b-5p expression ($r=-0.227$) and miR-450b-5p in various mammalian species was highly conserved. **Conclusion** CXXC4 inhibits the proliferation of PANC-1 cells in pancreatic cancer and promotes theirs apoptosis.

[Key words] CXXC finger protein 4; pancreatic cancer; PANC-1 cell; proliferation; apoptosis

胰腺癌是最常见的恶性肿瘤之一,是世界范围内的主要公共卫生问题^[1]。最新资料显示,2022 年中国新增 134 374 例胰腺癌患者和 131 203 例胰腺癌死亡患者^[2]。胰腺癌的首发症状不明显,限制了早期诊断和治疗^[3]。目前主要的治疗方法是根治性切除,即使是手术切除,复发率也较高^[4]。转移性胰腺癌患者的 5 年生存率低于 5%,表明目前的治疗策略对于改善患者的预后效果较差^[5]。

CXXC 指蛋白 4(CXXC finger protein 4, CXXC4)为果蝇无翅基因 Wnt/ β -连环蛋白(β -catenin)信号通路负性调控因子,该基因位于人染色体 4q24,在癌症的发生、发展过程中具有抑癌作用^[6]。在肾癌中 CXXC4 的低表达与患者的不良预后密切相关,敲降 CXXC4 可明显增强肾癌的恶性表型^[7]。CXXC4 通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路影响肿瘤生长^[8]。另外, CXXC4 高表达可抑制先天性中性粒细胞减少症白血病的发展^[9],以及胃癌细胞的增殖^[10],但其在胰腺癌中的作用尚未见报道。因此,本研究探讨 CXXC4 对胰腺癌细胞 PANC-1 的增殖和凋亡的影响,期望为临床诊断、靶向治疗提供新线索。

1 材料与方法

1.1 材料

人健康胰腺导管上皮细胞 HPNE 购自上海富衡生物科技有限公司,人胰腺癌细胞 PANC-1、AsPC-1、BxPC-3 购自武汉普诺赛公司。DMEM 高糖细胞培

养基和 RPMI-1640 细胞培养基青霉素-链霉素混合液、胰酶均购自北京中生奥邦生物科技有限公司,胎牛血清购自以色列 BI 有限公司, Lipofectamine2000 购自美国 Thermo 公司, TRIzol 总 RNA 提取试剂购自美国 Thermo 公司,试验过程中所用质粒 pcDNA3.1、pcDNA3.1-CXXC4(CXXC4 过表达质粒), 3 条 si-CXXC4(CXXC4 敲降 si-RNA, 标号分别为 si-CXXC4 #1、si-CXXC4 #2、si-CXXC4 #3) 及其对照 si-RNA (si-NC) 均购自通用生物(安徽)股份有限公司, CCK-8 试剂盒、EdU-555 细胞增殖检测试剂盒、驴抗兔荧光二抗、4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染液均购自上海碧云天生物技术有限公司。逆转录及实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)试剂盒购自北京聚合美生物科技有限公司,兔源抗 CXXC4 单克隆抗体购于武汉华美生物工程有限公司,10 $\times$ 电泳缓冲液、10 $\times$ 蛋白电转缓冲液、10 $\times$ 封闭-洗涤缓冲液(TBST)、ECL 发光液、羊抗兔二抗均购自北京普利莱基因技术有限公司,结晶紫染料购自天津化工有限公司。

1.2 方法

1.2.1 数据库在线分析

利用仙桃学术(<https://www.xiantao.love>)分析 TCGA 数据库中 41 种癌症总体生存期、患者预后与 CXXC4 的表达情况,并对其中胰腺癌及其癌旁组织 CXXC4 mRNA 表达水平进行分析。采用 GEPIA 数

数据库(<http://gepia.cancer-pku.cn/>)分析TCGA数据库中胰腺癌组织CXXC4 mRNA表达与胰腺癌TNM分期之间的关系。利用生物信息学网站(<https://www.targetscan.org/>、<http://mirdb.org/>和<http://starbase.sysu.edu.cn/>)预测CXXC4的上游miRNA,3个数据库取交集并筛选具有较高评分的miRNA。检索Starbase数据库,获取CXXC4与miR-450b-5p在胰腺癌中的表达相关性。ECR Browser(<https://ecrbrowser.dcode.org/>)分析基因的保守性。

1.2.2 细胞培养及分组

AsPC-1、BxPC-3 细胞采用含 10% 胎牛血清的 1640 完全培养基培养,HPNE 细胞、PANC-1 细胞采用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖完全培养基培养,配制完全培养基时均加入 1% 双抗。所有细胞放置于 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养,每隔 2~3 天用含有 0.02% 乙二胺四乙酸(EDTA)胰蛋白酶进行消化传代。实验组分为 si-NC 组、si-CXXC4 组、pcDNA3.1 组、pcDNA3.1-CXXC4 组,各组分别转染 si-NC、si-CXXC4、pcDNA3.1 和 pcDNA3.1-CXXC4,转染步骤参照 Lipofectamine2000 说明书,转染终浓度均为 20 nmol/L,转染 4~6 h 后换无双抗含血清的培养液。

1.2.3 qRT-PCR 检测基因表达水平

采用 TRIzol 法提取细胞总 RNA,通过 Nanodrop 仪器测定所提 RNA 质量及浓度,使用逆转录试剂盒将 mRNA 逆转录为 cDNA。使用 qRT-PCR 系统进行检测,引物由上海生工公司合成,序列见表 1,反应程序为两步法 PCR 扩增标准程序:95℃ 30 s,1 个循环;95℃ 5 s,60℃ 34 s,40 个循环。以 GAPDH 作为内参,使用 2^{-ΔΔCt} 计算基因相对表达量,试验重复 3 次。

表 1 引物序列		
基因	方向	序列(5'-3')
CXXC4	正向	CAT TCC TCC TCC TCC TCG TCC TC
CXXC4	反向	CGC CAC AGT TGA TGA GCC TCT
GAPDH	正向	CAG GAG GCA TTG CTG ATG AT
GAPDH	反向	GAA GGC CTG GGG CTC ATT T

1.2.4 Western blot 试验

细胞转染 48 h 后,提取总蛋白,使用 BCA 检测试剂盒测定细胞蛋白浓度。将蛋白变性后按照每孔 15 μg 上样,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜,脱脂奶粉室温封闭 2 h,然后在对应抗体中 4℃ 孵育过夜。第 2 天二抗孵育 2 h 后,ECL 显色,拍照后通过 ImageJ 软件分析条带灰度值,试验重复 3 次。

1.2.5 CCK-8 试验检测细胞增殖能力

取转染 24 h 的各组细胞,消化离心并计数,按实验分组将细胞悬液以密度为 5×10³/孔接种于 96 孔板中,每组 3 个复孔。在培养 24、48、72、96 h 后,每孔加入 100 μL 培养液和 10 μL CCK-8 试剂,温箱孵育 2 h,使用酶标仪在 450 nm 波长下进行吸光度 [$A_{(450\text{ nm})}$] 值检测,试验重复 3 次。

1.2.6 集落形成试验

每组细胞转染 24 h 后,每组设置 3 个复孔,将细胞悬液以 2×10³/孔的密度接种到 6 孔板上,每 2~3 天换液 1 次,10~15 d 后,镜下观察细胞成簇生长,终止培养,以细胞数>50 个作为集落形成的标准。结晶紫染色,在白色背景上进行拍摄和记录。

1.2.7 免疫荧光试验

将转染后的各组细胞适量接种在小皿中,待细胞长至约 50% 时,去除原有的培养基,磷酸盐缓冲液(PBS)缓冲液润洗。加入 4% 多聚甲醛固定 30 min,清洗后加入 0.2% Triton-X-100 打孔 10 min,使用 5% BSA 室温封闭 1 h。吸去封闭液,加入适量一抗,室温静置 30 min 后放入 4℃ 过夜。洗去一抗,荧光二抗室温避光孵育 45 min,PBS 缓冲液润洗 3 次。避光室温孵育细胞并采用 DAPI 染色 5 min,PBS 缓冲液润洗 3 次后,用荧光显微镜观察拍照。

1.2.8 EdU 试验

收集转染后的各组细胞适量接种于小皿中,根据 EdU 试剂盒说明书对细胞进行染色。荧光显微镜下检测,EdU 阳性(EdU⁺)细胞百分率=EdU⁺细胞数/细胞总数(DAPI 染色细胞数)×100%。

1.3 统计学处理

使用 SPSS19.0 软件进行统计学分析,运用 Graphpad Prism8.0 进行绘图。所有实验均独立重复 3 次,结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间差异比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较通过单因素方差,两组间分类变量比较采用 χ^2 检验。检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CXXC4 的生物信息学分析

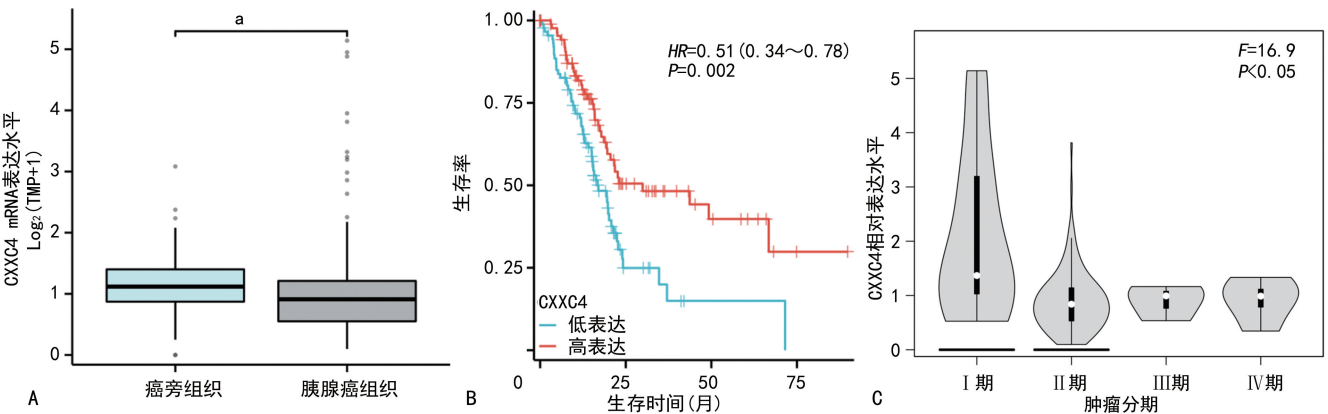
通过 TCGA 数据库分析 CXXC4 与 41 种癌症患者总体生存期的相关性,结果显示,CXXC4 与胰腺癌患者总体生存期有关($HR=0.59,95\%CI:0.39\sim0.90,P<0.05$)。

2.2 CXXC4 在胰腺癌中低表达且与胰腺癌患者良好的预后相关

通过分析 TCGA 数据库结果显示,与癌旁组织相比,CXXC4 在胰腺癌组织中表达水平降低($P<$

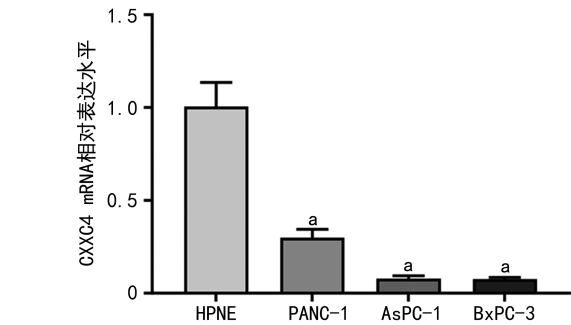
0.001),见图 1A。CXXC4 低表达胰腺癌患者较高表达患者预后差($P<0.05$),见图 1B。GEPIA 数据库结果显示,与 I 期胰腺癌相比,II 期胰腺癌中 CXXC4 表达降低($P<0.05$),见图 1C。

2.3 HPNE 细胞及 3 种胰腺癌细胞株中 CXXC4 表达情况



A: CXXC4 mRNA 在癌旁组织与胰腺癌中的表达水平比较;B: CXXC4 的表达与胰腺癌患者总体生存率的关系;C: CXXC4 表达水平与胰腺癌病理分期的相关性;^a: $P<0.001$ 。

图 1 CXXC4 在胰腺癌中低表达且与胰腺癌患者的预后相关



^a: $P<0.0001$,与 HPNE 组比较。
图 2 CXXC4 mRNA 在不同细胞株中表达情况

2.4 CXXC4 敲降和过表达效率检测

为验证转染有效性,在 PANC-1 细胞分别瞬时转染 CXXC4 siRNA 及 pcDNA3.1-CXXC4 质粒,通过 Western blot 试验检测 CXXC4 在胰腺癌细胞 PANC-1 中蛋白表达水平。结果显示,与 si-NC 组相比,si-CXXC4 #3 敲降效果最为显著($P<0.05$)。后续实验选择 si-CXXC4 #3 进行敲降,见图 3A、B;与 pcDNA3.1 组相比,pcDNA3.1-CXXC4 组 CXXC4 蛋白表达水平升高($P<0.05$),见图 3C、D。

2.5 敲降和过表达 CXXC4 对 PANC-1 细胞增殖能力的影响

CCK-8 和集落形成实验结果显示,与 si-NC 组相比,si-CXXC4 组细胞的增殖和集落形成能力增强($P<0.05$),与 pcDNA3.1 组相比,pcDNA3.1-CXXC4 组细胞的增殖和集落形成能力减弱($P<$

采用 qRT-PCR 检测人正常胰腺导管上皮细胞 HPNE 及 3 种胰腺癌细胞 PANC-1、AsPC-1 和 BxPC-3 中 CXXC4 mRNA 的表达水平,结果提示,与 HPNE 细胞相比,在 3 种胰腺癌细胞 PANC-1、AsPC-1 和 BxPC-3 中 CXXC4 mRNA 的表达均降低($P<0.0001$),见图 2。

0.05),见图 4。EdU 试验结果显示,与 si-NC 组相比,si-CXXC4 组 EdU⁺ 细胞数升高($P<0.001$),与 pcDNA3.1 组相比,pcDNA3.1-CXXC4 组 EdU⁺ 细胞数降低($P<0.01$),见图 5。

2.6 敲降和过表达 CXXC4 对 PANC-1 细胞增殖标志物表达水平的影响

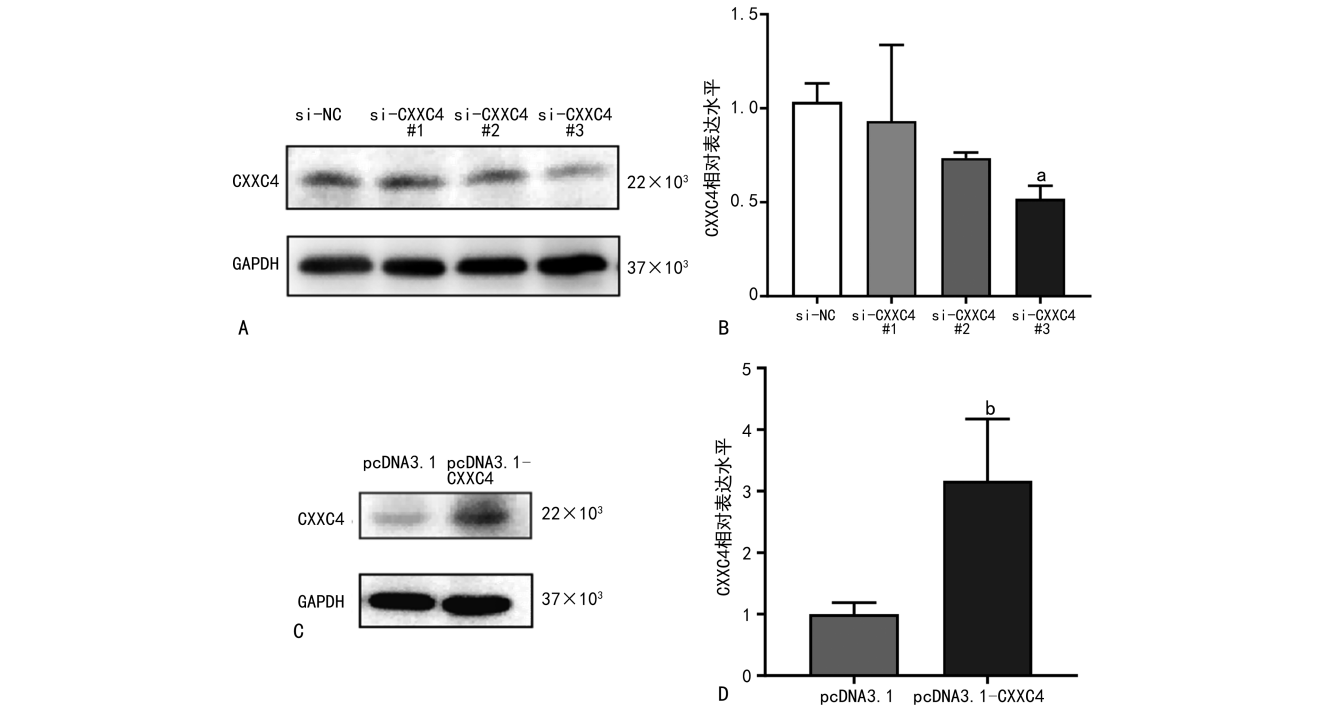
免疫荧光试验检测 CXXC4 对 PANC-1 细胞增殖能力的影响,与 si-NC 组相比,si-CXXC4 组细胞增殖标志物 Ki67、增殖细胞核抗原(PCNA)的表达升高,与 pcDNA3.1 组相比,pcDNA3.1-CXXC4 组细胞增殖标志物 Ki67、PCNA 的表达降低,见图 6。

2.7 敲降和过表达 CXXC4 对 PANC-1 细胞凋亡标志物表达水平的影响

免疫荧光实验检测 CXXC4 对 PANC-1 细胞凋亡的影响,与 si-NC 组相比,si-CXXC4 组细胞凋亡标志物 Bax、caspase-3、caspase-9 的表达降低;与 pcDNA3.1 组相比,pcDNA3.1-CXXC4 组细胞凋亡标志物 Bax、caspase-3、caspase-9 的表达升高,见图 7。

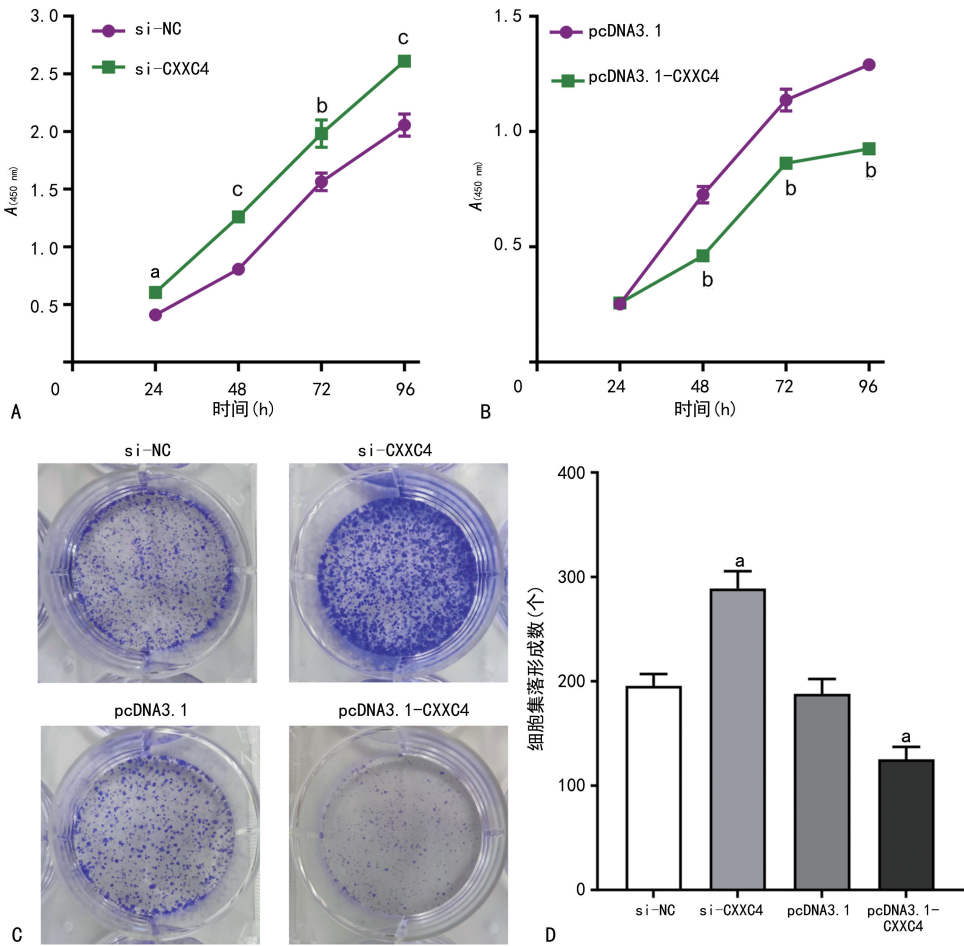
2.8 CXXC4 上游 miRNAs 的筛选与预测

利用 3 个生物信息学网站(TargetScan、miRDB 和 ENCORI)预测 CXXC4 的上游 miRNA,筛选出 44 个上游 miRNA。经查阅相关文献,miR-450b-5p 在结直肠癌、肺鳞状细胞癌中发挥促癌基因的作用,后续将以 miR-450b-5p 为研究对象,研究其在胰腺癌中是否也发挥促癌基因的作用。



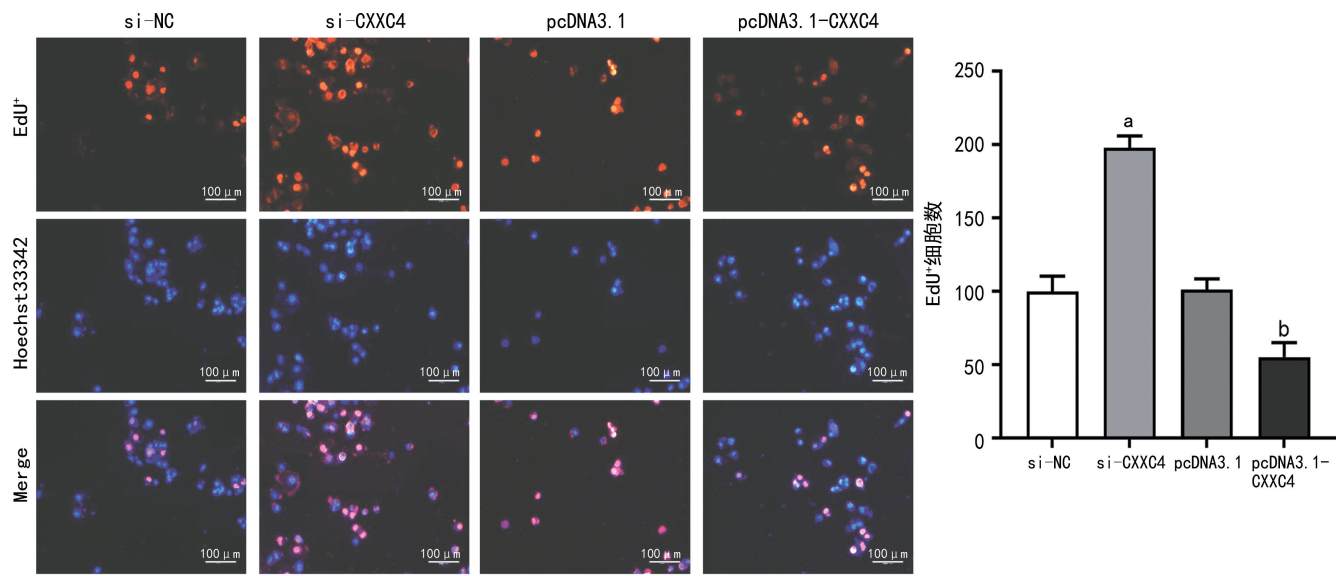
A: Western blot 实验检测转染 si-CXXC4 后 CXXC4 蛋白表达图谱;B: Western blot 实验检测转染 si-CXXC4 后 CXXC4 表达在 4 组间的比较; C: Western blot 实验检测转染 pcDNA3.1-CXXC4 后 CXXC4 蛋白表达图谱;D: Western blot 实验检测转染 pcDNA3.1-CXXC4 后 CXXC4 表达在两组间的比较;^a: $P < 0.001$, 与 si-NC 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 pcDNA3.1 组比较。

图 3 敲降或过表达组 PANC-1 细胞中 CXXC4 的相对表达水平



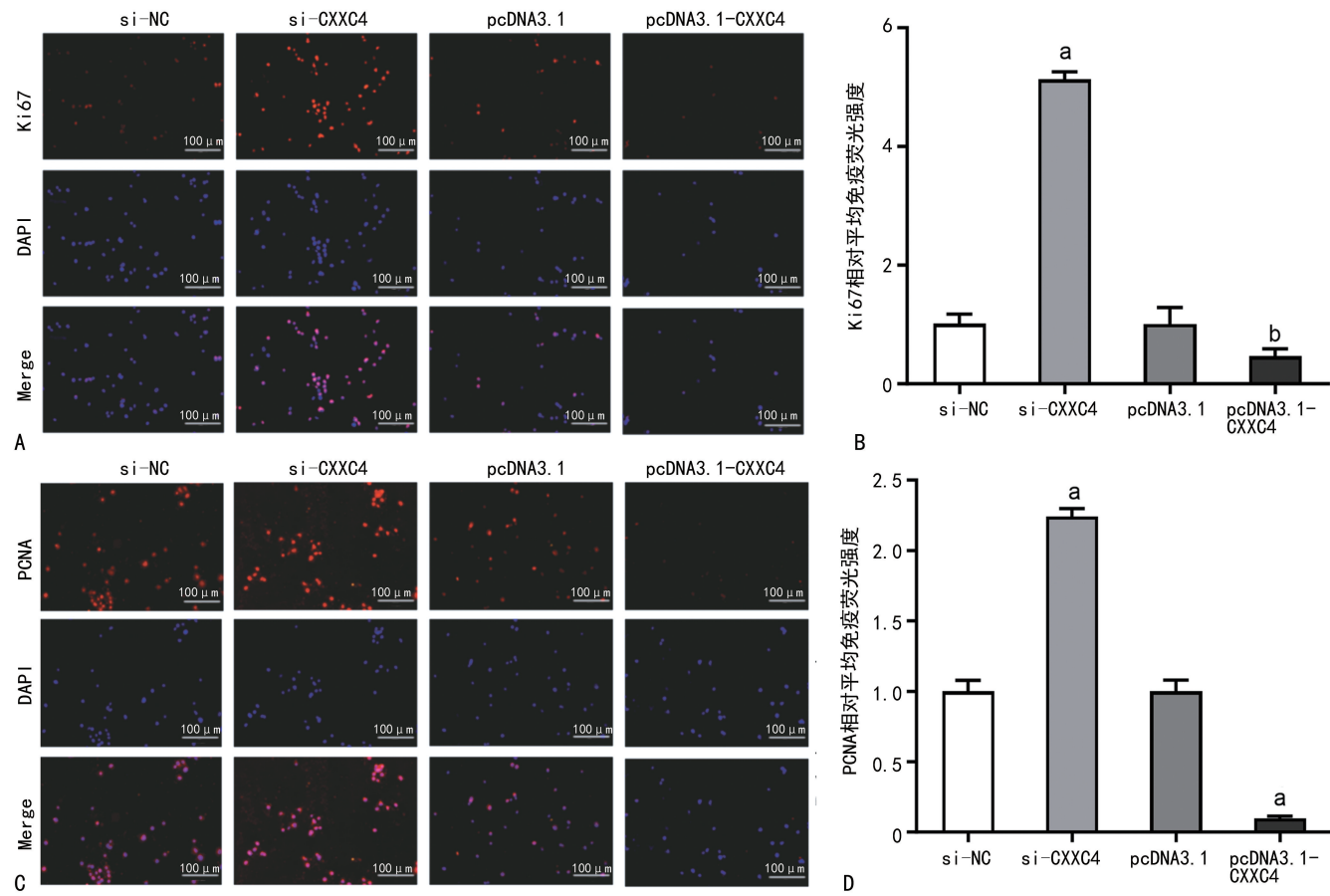
A: CCK-8 检测转染 si-CXXC4 后细胞的增殖能力;B: CCK-8 检测转染 pcDNA3.1-CXXC4 后细胞的增殖能力;C: 细胞集落形成;D: 细胞集落形成量化结果;^a: $P < 0.01$, ^b: $P < 0.0001$, 与 si-NC 组或 pcDNA3.1 组比较; ^c: $P < 0.001$, 与 si-NC 组比较。

图 4 过表达或敲降 CXXC4 表达后 PANC-1 细胞的增殖和集落形成能力



^a: $P < 0.001$, ^b: $P < 0.01$, 与 si-NC 组或 pcDNA3.1 组比较; EdU⁺: 活细胞内核酸染色; Hoechst33342: 活细胞核标记染色; Merge: EdU⁺ 和 Hoechst33342 混合。

图 5 CXXC4 抑制 PANC-1 细胞增殖



A,C: 免疫荧光实验检测 Ki67 和 PCNA 在 PANC-1 细胞中表达; B,D: 量化结果; ^a: $P < 0.0001$, 与 si-NC 组或 pcDNA3.1 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 pcDNA3.1 组比较。

图 6 CXXC4 对 PANC-1 细胞中 Ki67 和 PCNA 表达的影响

2.9 CXXC4 与 miR-450b-5p 相关性以及在多种哺乳动物中物种保守性分析

生物信息学网站 Starbase 数据库结果显示, 在胰腺癌组织中, miR-450b-5p 的表达与 CXXC4 呈负相

关($r = -0.227, P < 0.001$)。通过 ECR Browser 对 miR-450b-5p 进行保守性分析, 结果显示: 在多种哺乳动物(黑猩猩、大鼠、小鼠、牛、狗、恒河猴)中 miR-450b-5p 保守性较高。

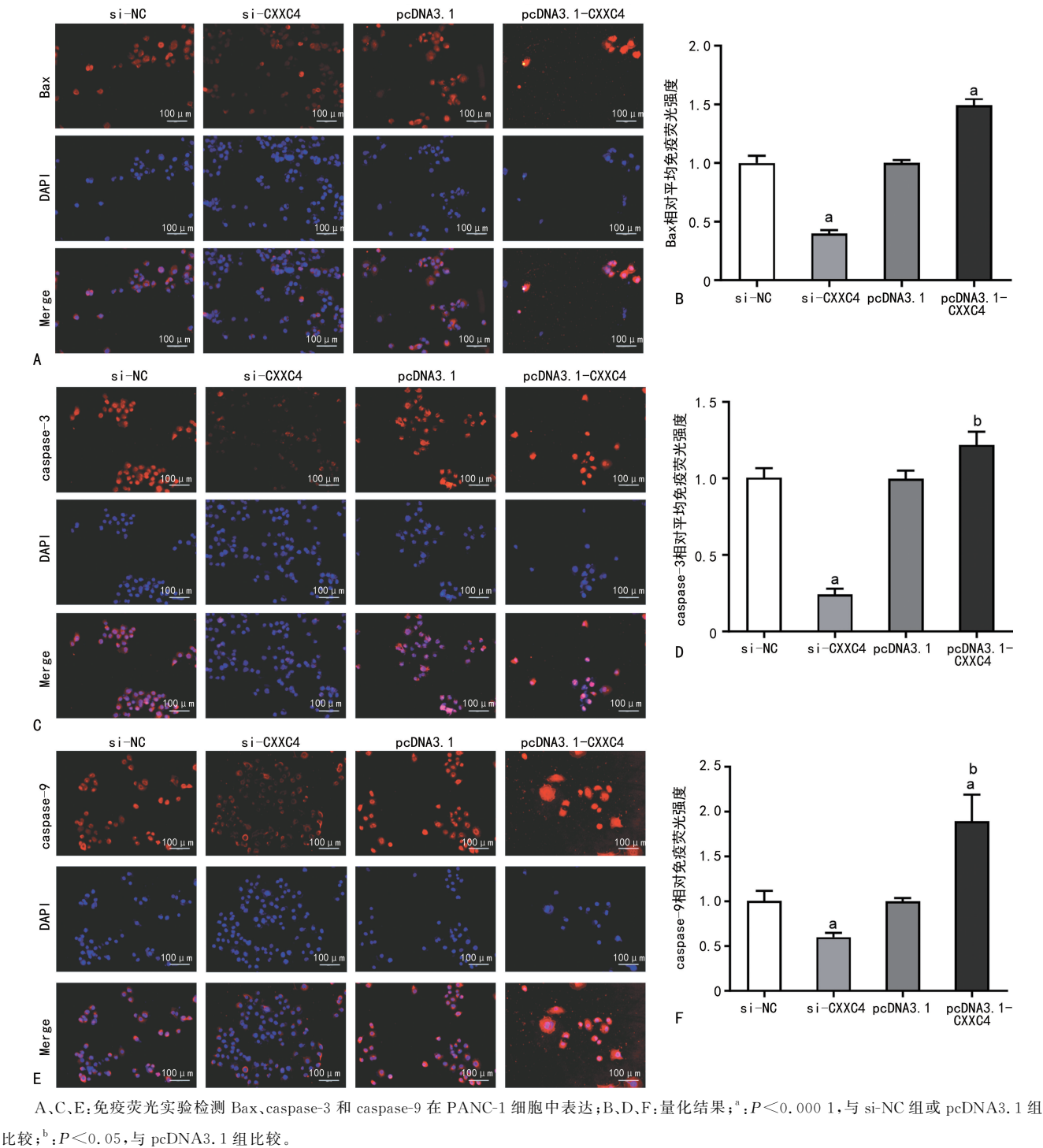


图 7 CXXC4 对 PANC-1 细胞凋亡能力的影响

3 讨 论

胰腺癌是全球癌症相关死亡的主要原因之一，目前由于缺乏胰腺癌早期精准诊断的方法和技术，胰腺癌通常在疾病的后期阶段被检测到。全球晚期胰腺癌患者 5 年生存率低于 9%^[11]。因此，迫切需要对病因和相关机制进行进一步的研究。近年来，相关学者对该病分子生物学水平领域不断研究，从细胞和分子水平上实现对胰腺癌细胞的分子靶定，从而成为一种新的药物研发趋势^[12-14]。

CXXC4 是近年来发现的一种新型抑癌基因，参与调控 β -catenin 信号通路。有文献报道，CXXC4 通过特殊的“KTXXXI”基序直接与 Dvl1 的 PDZ 结构域相互结合，抑制 Dvl，募集 Axin-GSK-3 β ，进而使 β -catenin 降解复合物更加稳定^[15]。CXXC4 通过调节 GSK-3 β 的磷酸化，破坏 β -catenin 复合物完整性、抑制 Wnt/ β -catenin 信号转导，从而抑制乳腺癌细胞增殖，且增强细胞对三苯氧芬药物的敏感性^[16]。CXXC4 可以靶向 c-Myc、EZH2、SOX2- β ，抑制肝癌细

胞增殖^[17]。细胞的异常增殖和凋亡是胰腺癌发生、发展的重要条件^[18],研究发现伞丙烯素增加了 caspase-3、caspase-8 和 Bax 的裂解,同时降低了 Bcl-2 的表达来诱导胰腺癌细胞凋亡^[19]。Ki67 是细胞增殖的敏感指标^[20]。本研究发现 CXXC4 可上调 PANC-1 细胞凋亡标志物 Bax、caspase-3 和 caspase-9 的表达,以及下调增殖相关蛋白 Ki67 和 PCNA 的表达。miRNA 可以通过负向调控下游靶基因表达发挥转录后调控作用^[21-22]。胃癌细胞分泌的 miR-675-3p 外泌体抑制 CXXC4 的表达,激活 MAPK 信号通路的转导,促进 PD-L1 的表达,抑制 T 细胞的增殖和活化,刺激胃癌细胞的免疫逃逸并增强细胞对顺铂的耐药性^[23]。

本研究结果显示,CXXC4 与患者总体生存期和预后不良相关;在人胰腺癌组织与细胞中的表达明显低于癌旁胰腺组织及人健康胰腺导管上皮细胞中的表达。同时,与 CXXC4 高表达患者相比,低表达 CXXC4 的胰腺癌患者总体生存期更短,敲低 CXXC4 可以促进胰腺癌细胞的增殖并抑制胰腺癌细胞的凋亡,而过表达 CXXC4 可以抑制胰腺癌细胞的增殖并促进胰腺癌细胞的凋亡。数据库预测到 miR-450b-5p 可能是调控 CXXC4 表达的 miRNA。Starbase 数据库结果显示在胰腺癌组织中 CXXC4 与 miR-450b-5p 表达呈负相关。检索 ECR Browser 网站结果显示 miR-450b-5p 在多种哺乳动物中物种保守性较高。miR-450b-5p 在结直肠癌^[24]、胶质母细胞瘤^[25]、肺鳞状细胞癌^[26]等癌症中具有促癌作用,与本研究 Starbase 数据库的预测结果 miR-450b-5p 的表达与 CXXC4 呈负相关一致,后续课题组将继续探究 miR-450b-5p 在胰腺癌中的作用,以及 CXXC4 与 miR-450b-5p 的靶向关系,为胰腺癌的早期诊断和治疗提供更多依据。

综上所述,CXXC4 发挥抑癌基因的作用,参与胰腺癌发生发展的机制可能与调控细胞增殖、凋亡能力有关。

参考文献

[1] XU X,YU Y,ZONG K,et al. Up-regulation of IGF2BP2 by multiple mechanisms in pancreatic cancer promotes cancer proliferation by activating the PI3K/Akt signaling pathway[J]. J Exp Clin Cancer Res,2019,38(1):497-521.

[2] XIA C,DONG X,LI H,et al. Cancer statistics in China and United States 2022:profiles trends and determinants[J]. Chin Med J (Engl),2022,

135(5):584-590.

[3] FENG H,WEI B,ZHANG Y. Long non-coding RNA HULC promotes proliferation migration and invasion of pancreatic cancer cells by down-regulating microRNA-15a[J]. Int J of Bio Macromol,2019,126:891-898.

[4] 徐华祥,刘亮. 精准医学在胰腺癌新辅助治疗和辅助治疗中应用[J]. 中国实用外科杂志,2023,43(7):743-749.

[5] GUO S,FESLER A,HUANG W,et al. Functional significance and therapeutic potential of miR-15a mimic in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. Mol Ther Nucleic Acids,2020,19:228-239.

[6] 张力,包和婧,邓天伟,等. hsa_circ_0005692 吸附 miR-625-5p 调节 CXXC4 的表达而抑制胃癌的转移[J]. 中国比较医学杂志,2021,31(2):58-66.

[7] GORKA J,MARONA P,KWAPISZ O,et al. MCP1 inhibits Wnt/ β -catenin signaling pathway activity and modulates epithelial-mesenchymal transition during clear cell renal cell carcinoma progression by targeting miRNAs[J]. Oncogene,2021,40(50):6720-6735.

[8] GUAN B,ZHAN Z,WANG L,et al. CXXC4 mediates glucose-induced β -cell proliferation[J]. Acta Diabetol,2020,57(9):1101-1109.

[9] OLOFSEN P A,FATRAI S,VAN STRIEN P M H,et al. Malignant transformation involving CXXC4 mutations identified in a leukemic progression model of severe congenital neutropenia[J]. Cell Rep Med,2020,1(5):100074.

[10] LI P,GE D,LI P,et al. CXXC finger protein 4 inhibits the CDK18-ERK1/2 axis to suppress the immune escape of gastric cancer cells with involvement of ELK1/MIR100HG pathway[J]. J Cell Mol Med,2020,24(17):10151-10165.

[11] LANE J S,HOFF D V,CRIDEBRING D,et al. Extracellular vesicles in diagnosis and treatment of pancreatic cancer:current state and future perspectives[J]. Cancers (Basel),2020,12(6):1530-1546.

[12] CHEN L,ZHANG J,WANG X,et al. Discovery of novel KRAS-PDE δ inhibitors with potent

- activity in patient-derived human pancreatic tumor xenograft models[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022,12(1):274-290.
- [13] KUANG Y, YE N, KYANI A, et al. Induction of genes implicated in stress response and autophagy by a novel quinolin-8-yl-nicotinamide QN523 in pancreatic cancer[J]. *J Med Chem*, 2022,65(8):6133-6156.
- [14] YAO H, SONG W, CAO R, et al. An EGFR/HER2-targeted conjugate sensitizes gemcitabine-sensitive and resistant pancreatic cancer through different SMAD4-mediated mechanisms[J]. *Nat Commun*, 2022,13(1):5506.
- [15] YU W, LIU N, SONG X, et al. EZH2: an accomplice of gastric cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2023,15(2):425.
- [16] FU Y, WANG Z, LUO C, et al. Downregulation of CXXC finger protein 4 leads to a tamoxifen-resistant phenotype in breast cancer cells through activation of the Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Transl Oncol*, 2020,13(2):423-440.
- [17] LIU S, QIU J, HE G, et al. Dermatopontin inhibits WNT signaling pathway via CXXC finger protein 4 in hepatocellular carcinoma [J]. *J Cancer*, 2020,11(21):6288-6298.
- [18] HE L H, HE Y L, ZUO W H, et al. Neuropilin1 silencing impairs the proliferation and migration of cells in pancreatic cancer[J]. *J Clin Lab Anal*, 2020,34(9):e23394.
- [19] WANG H, LIU Y, WANG Y, et al. Umbelliprenin induces autophagy and apoptosis while inhibits cancer cell stemness in pancreatic cancer cells[J]. *Cancer Med*, 2023,12(14):15277-15288.
- [20] MROUJ K, ANDRÉS-SÁNCHEZ N, DUBRA G, et al. Ki-67 regulates global gene expression and promotes sequential stages of carcinogenesis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021,118(10):e2026507118.
- [21] CHAKRABORTTY A, PATTON D J, SMITH B F, et al. MiRNAs: potential as biomarkers and therapeutic targets for cancer [J]. *Genes (Basel)*, 2023,14(7):1375.
- [22] PREETHI K A, SELVAKUMAR S C, ROSS K, et al. Liquid biopsy: exosomal microRNAs as novel diagnostic and prognostic biomarkers in cancer [J]. *Mol Cancer*, 2022,21(1):54.
- [23] LI P, LUO X, XIE Y, et al. GC-derived EVs enriched with microRNA-675-3p contribute to the MAPK/PD-L1-mediated tumor immune escape by targeting CXXC4 [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020,22:615-626.
- [24] YE Y P, WU P, GU C C, et al. MiR-450b-5p induced by oncogenic KRAS is required for colorectal cancer progression[J]. *Oncotarget*, 2016,7(38):61312-61324.
- [25] ZHANG J, FURUTA T, SABIT H, et al. Ge-Isolin inhibits malignant phenotype of glioblastoma and is regulated by miR-654-5p and miR-450b-5p[J]. *Cancer Sci*, 2020,111(7):2413-2422.
- [26] YE P, LV X, AIZEMAITI R, et al. H3K27ac-activated LINC00519 promotes lung squamous cell carcinoma progression by targeting miR-450b-5p/miR-515-5p/YAP1 axis [J]. *Cell Prolif*, 2020,53(5):e12797.

(收稿日期:2024-01-26 修回日期:2024-05-29)

(编辑:石 芸)