

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.08.003

核心蛋白聚糖在胰腺癌 beta 细胞功能中的作用及对线粒体分离融合的影响^{*}

张 荣,吕海龙,杨一邨,王浩斌,黄江涛,张 抒[△]
(四川省成都市第三人民医院普外科 610031)

[摘要] **目的** 探究核心蛋白聚糖(DCN)在胰腺癌组织中的表达及对胰岛 beta 细胞线粒体分离融合的影响。**方法** 征集 21 例胰腺导管腺癌(PDAC 组)、25 例胰腺神经内分泌肿瘤(PNET 组)和 4 例健康者(健康组)胰腺组织;免疫组织化学检测胰腺组织中 DCN 表达;免疫荧光法检测胰腺组织中线粒体融合蛋白 2(MFN2)和动力相关蛋白 1(DRP1)表达情况;蛋白免疫印迹(Western blot)法检测胰腺组织中 DCN、线粒体分裂因子(MFF)、MFN1、MFN2、视神经萎缩症蛋白 1(OPA1)、DRP1 和线粒体分裂蛋白 1(FIS1)表达;CCK-8 法检测正常糖培养条件下 DCN(0、1、10、100 和 200 nmol/L)处理对人胰岛 β 细胞(0、12、24 和 48 h)增殖的影响;胰岛 β 细胞分为 2 组:正常糖和高糖(HG)培养,均分别采用 0 nmol/L 和 100 nmol/L DCN 处理细胞 24 h,CCK-8 法再次检测各组细胞增殖,Annexin V/PI 染色检测各组细胞凋亡,酶联免疫吸附实验检测各组细胞培养上清液中胰岛素分泌量,Western blot 法检测 MFF、MFN1、MFN2、OPA1、DRP1、FIS1、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶(P22^{phox})、磷酸化丝裂原活化蛋白激酶 p38 亚基(p-p38)、p38、胰岛素样生长因子 I 受体蛋白(IGFIR)、磷酸化蛋白激酶 B(p-AKT)和 AKT 的表达。**结果** 与健康组比较,PDAC 和 PNET 组癌组织中 DCN、DRP1、FIS1 和 MFF 表达水平明显降低,MFN1、MFN2 和 OPA 表达水平明显升高($P<0.05$);在正常糖条件下,100 nmol/L 和 200 nmol/L DCN 处理 24 h 和 48 h 的细胞增殖倍数均明显高于对应时间点的 0 nmol/L DCN 组,且具有时间和剂量依赖性($P<0.05$);在正常糖和 HG 条件下,100 nmol/L DCN 组的细胞增殖倍数均明显高于 0 nmol/L DCN 组($P<0.05$);在正常糖和 HG 条件下,100 nmol/L DCN 组的 AnnexinV⁺PI⁺ 细胞比例较 0 nmol/L DCN 组无明显变化($P>0.05$);无论正常糖或是 HG 条件下,0 nmol/L DCN 组 IGFIR 表达水平与 100 nmol/L DCN 组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);在正常糖条件下,100 nmol/L DCN 组的培养上清液中胰岛素分泌量,细胞中 DRP1、FIS1、MFF、P22^{phox}、p-p38 和 p-AKT 表达水平明显高于 0 nmol/L DCN 组($P<0.05$),MFN1、MFN2 和 OPA 表达水平低于 0 nmol/L DCN 组($P<0.05$);在 HG 条件下,100 nmol/L DCN 组培养上清液中胰岛素分泌量,细胞中 P22^{phox} 和 p-p38 表达明显高于 0 nmol/L DCN 组($P<0.05$),DRP1、MFN2 和 OPA 表达明显低于 0 nmol/L DCN 组($P<0.05$)。**结论** DCN 可通过激活 P22^{phox}/MAPK 通路调控胰岛 β 细胞的增殖、胰岛素分泌和线粒体融合分裂。

[关键词] 胰腺癌;核心蛋白聚糖;胰岛 β 细胞;线粒体分裂;线粒体融合;P22^{phox}/MAPK 通路
[中图法分类号] R576 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2022)08-1272-07

The role of decorin in the function of pancreatic cancer beta cells and its influence on the separation and fusion of mitochondria^{*}

ZHANG Rong, LVU Hailong, YANG Yicun, WANG Haobin, HUANG Jiangtao, ZHANG Shu[△]
(Department of General Surgery, the Third People's Hospital of Chengdu, Chengdu, Sichuan 610031, China)

[Abstract] **Objective** To explore the expression of decorin (DCN) in pancreatic cancer tissues and its effect on the mitochondrial fission and fusion of pancreatic beta cells. **Methods** Pancreatic tissues were collected from 21 case of pancreatic ductal adenocarcinoma (the PDAC group), 25 case of pancreatic neuroendocrine tumors (the PNET group) and 4 case of healthy persons (the healthy group). The expression of DCN in pancreatic tissue was detected by immunohistochemistry and Western blot. The protein expression levels of mitochondrial fusion protein 2 (MFN2) and dynamo-related protein 1 (DRP1) in pancreatic tissue were detected

^{*} 基金项目:国家自然科学基金项目(81702963)。 作者简介:张荣(1984—),主治医师,硕士,主要从事核心蛋白聚糖在胰腺癌 beta 细胞功能中的作用的研究。[△] 通讯作者,E-mail:260401545@qq.com。

by immunofluorescence. The protein expression levels of DCN, mitochondrial fission factor (MFF), MFN1, MFN2, optic atrophy protein 1 (OPA1), DRP1 and mitochondrial fission protein 1 (FIS1) in pancreatic tissue were detected by Western blot. CCK-8 method was used to detect the effects of DCN (0, 1, 10, 100 and 200 nmol/L) on the proliferation of human pancreatic β cells (0, 12, 24 and 48 h) under normal glucose culture conditions. Pancreatic β cells were divided into two groups: the normal glucose group and the high glucose group, treated with 0 nmol/L and 100 nmol/L DCN for 24 h, respectively. The proliferation of human pancreatic β cells was detected again by CCK-8 method. The apoptosis was detected by Annexin V/PI staining. Insulin secretion was detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The protein expression levels of MFF, MFN1, MFN2, OPA1, DRP1, FIS1, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (P22^{phox}), phosphorylated mitogen-activated protein kinase P38 subunit (p-p38), p38, insulin-like growth factor I receptor protein (IGFIR), phosphate expression of protein kinase B (p-AKT) and AKT were detected by Western blot.

Results Compared with the healthy group, the expression levels of DCN, DRP1, FIS1 and MFF in the cancer tissues of the PDAC and the PNET groups were significantly decreased, and the expression levels of MFN1, MFN2 and OPA were significantly increased ($P < 0.05$). Under normal glucose conditions, the proliferation of pancreatic β cells treated with 100, 200 nmol/L DCN for 24 h and 48 h was significantly higher than those in the 0 nmol/L DCN group corresponding to the time point, and it was time- and dose-dependent ($P < 0.05$). Under normal glucose and high glucose conditions, the cell proliferation in the 100 nmol/L DCN group was significantly higher than those in the 0 nmol/L DCN group ($P < 0.05$). Under normal glucose and high glucose condition, the Annexin V⁺PI⁻ cell ratio in the 100 nmol/L DCN group had no significant change when compared with the 0 nmol/L DCN group ($P > 0.05$). Under normal group and high glucose condition, the expression level of IGFIR in the 100 nmol/L DCN group had no significant difference when compared with the 0 nmol/L DCN group ($P > 0.05$). Under normal glucose conditions, the insulin secretion and the expression levels of DRP1, FIS1, MFF, P22^{phox}, p-p38 and p-AKT proteins in the cells 100 nmol/L DCN group of the 100 nmol/L DCN group were significantly higher than those in the 0 nmol/L DCN group ($P < 0.05$), and the expression levels of MFN1, MFN2 and OPA proteins were in the 100 nmol/L DCN group lower than those in the 0 nmol/L DCN group ($P < 0.05$). Under the high glucose condition, the insulin secretion and the expression levels of P22^{phox} and p-p38 in the cells of the 100 nmol/L DCN group were significantly higher than those of the 0 nmol/L DCN group ($P < 0.05$), and the expressions of DRP1, MFN2 and OPA were significantly lower than those of the 0 nmol/L DCN group ($P < 0.05$). **Conclusion** DCN can regulate the proliferation, insulin secretion and mitochondrial fusion and division of pancreatic β cells by activating P22^{phox}/MAPK pathway.

[Key words] pancreatic cancer; decorin; pancreatic β cells; mitochondrial fission; mitochondrial fusion; P22^{phox}/MAPK pathway

胰腺癌是消化道常见恶性肿瘤之一。其预后差, 生存率低^[1]。随着我国人口老龄化和糖尿病发病率的升高, 胰腺癌将成为危害我国国民健康的重大疾病之一^[2]。然而, 目前关于胰腺癌依旧缺乏行之有效的诊断和治疗手段^[1-2]。胰腺癌常分为胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)和胰腺神经内分泌肿瘤(pancreatic neuroendocrine tumors, PNET)。最新证据显示, 占据胰腺癌 95% 的 PDAC 与代谢紊乱导致的骨骼肌、脂肪和肿瘤细胞消耗增加密切相关^[3-4]。但目前对胰腺癌的代谢和分子机制尚未阐明。

核心蛋白聚糖(decorin, DCN)是富含亮氨酸的小蛋白聚糖家族的重要成员^[5]。研究报道, DCN 具有调控癌细胞和内皮细胞增殖、凋亡, 巨噬细胞极化和小鼠糖耐受等作用^[6-7]。DCN 通过过氧化物酶体增殖物激活的受体 γ 共激活分子-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α , PGC1-

α)调控米托他汀诱导乳腺癌细胞的线粒体自稳^[8]。DCN 可诱导血管内皮生长因子受体 2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2)依赖性的线粒体片段化和线粒体膜电位的丧失^[5]。DCN 介导的抑癌作用作为上皮癌潜在的未来辅助疗法具有重要价值^[9]。线粒体的分离融合是细胞生长及其功能的代谢基础。然而, DCN 与线粒体的分离融合在胰腺癌发生发展中的作用尚未见报道。本研究通过研究胰腺癌组织中 DCN 的表达和其对胰岛 β 细胞线粒体的分离融合的影响与分子机制, 以揭示 DCN 和胰腺癌胰岛 β 细胞线粒体的分离融合失衡间的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

征集 2018 年 6 月至 2021 年 2 月本院诊断为 PDAC 患者 21 例(PDAC 组), PNET 患者 25 例(PNET 组)及健康志愿者 4 例(健康组)。收集患者

肿瘤组织及健康志愿者胰腺组织。(1)PCAC 及 PENET 患者诊断和纳入标准:手术前未经放化疗等任何形式的治疗;经影像学诊断且肿瘤标志物 CA19-9 阳性。(2)排除标准:合并其他恶性肿瘤及存在严重器质性疾病者;伴精神疾病者或认知障碍者。PDAC 组患者年龄(49.65 ± 5.85)岁;PNET 组患者年龄(52.96 ± 8.85)岁。健康组人群的年龄(40.21 ± 4.33)岁。本文研究经本院伦理委员会审核批准,所有患者、志愿者均对本研究知情并签署知情同意书。

1.2 免疫组织化学检测

组织置于 4%多聚甲醛溶液固定,常规脱水、包埋并切片、脱蜡和水化。采用柠檬酸缓冲液高温修复 30 min。加入兔抗人 DCN 多克隆抗体(1:200,武汉三鹰生物技术有限公司),4℃过夜,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:500,武汉 Abclonal 公司),室温孵育 1 h,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。DAB 显色液(北京中杉金桥生物技术有限公司)显色 1 min,自来水冲洗 5 min。ddH₂O 漂洗 5 min。常规复染,脱水,透明和封片。采用 Image-Pro Plus 6.0 分析其染色情况。

1.3 免疫荧光检测

组织置于 4%多聚甲醛溶液固定,常规脱水、包埋并切片、脱蜡和水化。采用柠檬酸缓冲液高温修复 30 min。加入兔抗人 MFN2 多克隆抗体和小鼠抗人 DRP1 多克隆抗体(1:200,武汉三鹰生物技术有限公司),4℃过夜,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。加入 FITC 和 CoraLite594 标记的二抗(1:500,武汉三鹰生物技术有限公司),室温孵育 1 h。PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。DAPI 染色 30 s,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。抗荧光淬灭剂(武汉塞维尔生物科技有限公司)封片,荧光显微镜拍照,采用 Image-Pro Plus 6.0 分析其染色面积。

1.4 小鼠胰岛 β 细胞培养及分组

小鼠胰岛 β 细胞 NIT-1 在含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中培养。胰酶消化重悬,悬液 $500 \times g$ 4℃离心 10 min 后计数并接种至细胞培养板中,置于 37℃ 5% CO₂ 孵箱培养 24 h 后,更换 2% 胎牛血清培养基培养 6 h 同步化,更换完全培养基,依次加入 0、1、10、100 和 200 nmol/L DCN 处理 0、12、24 和 48 h。或更换为含 0 nmol/L 或 100 nmol/L 的 DCN(D8428,美国 Sigma-Aldrich)的正常葡萄糖培养基或高糖(HG)培养基(武汉塞维尔生物科技有限公司)培养 24 h,分为正常糖条件下的 0 nmol/L DCN 组、10 nmol/L DCN 组和高糖条件下的 0 nmol/L DCN 组、10 nmol/L DCN 组。

1.5 CCK-8 实验

细胞增殖实验采用 CCK-8 比色法检测,参照 CCK-8 试剂盒说明书,细胞经消化计数后,以 2×10^3 /孔的细胞数接种细胞至 96 孔培养板中,每孔加入 10 μL 的 CCK-8 溶液,混匀后培养 2 h 后于 450

nmol/L 处检测各孔光密度(OD)值,绘制细胞增殖曲线图。

1.6 流式细胞实验

对数生长期的细胞经消化计数后,以 5×10^4 /孔的数接种细胞至 12 孔培养板中,37℃ 5% CO₂ 培养 24 h 后,更换为 HG 培养基(武汉塞维尔生物科技有限公司)和(或)100 nmol/L 的 PCN 培养 24 h。每孔细胞以乙二胺四乙酸(EDTA)消化液消化收集细胞,冷 PBS 洗涤 3 次,细胞沉淀加入 1% BSA 400 μL 重悬后,加入 2.5 μL Annexin V-FITC 抗体(上海碧云天生物科技有限公司),室温孵育 30 min,PBS 洗涤 1 次,400 μL PBS 重悬后加入 2.5 μL 碘化丙啶(PI)染料(武汉塞维尔生物科技有限公司),并使用 LSR-II 流式细胞仪(美国 BD Biosciences 公司)进行检测。使用 FlowJo 软件对结果进行分析。

1.7 胰岛素检测实验

取细胞培养上清液 100 μL,按胰岛素 ELISA 检测试剂盒(上海碧云天生物)使用说明书操作,使用 BioTek 5.0 酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔的 OD 值。

1.8 Western blot 检测

取组织加入 1 mL 含蛋白酶抑制剂和磷酸化酶抑制剂的 RIPA 裂解液(武汉塞维尔生物科技有限公司),组织置于玻璃组织匀浆器中,于冰上充分碾碎组织,冰上孵育 10 min。收集至 1.5 mL Ep 管中,超声 10 s,2 个循环。 $14\ 000 \times g$ 4℃离心 20 min 后收集上清。细胞加入 0.5 mL 含蛋白酶抑制剂和磷酸化酶抑制剂的 RIPA 裂解液,冰上孵育 10 min,收集至 1.5 mL Ep 管中,超声 10 s,2 个循环。 $14\ 000 \times g$ 4℃离心 20 min 后收集上清液。上清液采用 BCA 法检测蛋白浓度并 95℃干热变性 10 min。组织以 60 μg 总蛋白,细胞以 30 μg 总蛋白上样量行 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分离,200 mA 恒流湿转 2 h 至聚偏氟乙烯膜(PVDF)上,5% BSA 的 TBST 溶液室温封闭 1 h,加入一抗 DCN、线粒体分裂因子(MFF)、线粒体融合蛋白 1(MFN1)、MFN-2、视神经萎缩症蛋白 1(OPA1)、动力相关蛋白 1(DRP1)、线粒体分裂蛋白 1(FIS1)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶(P22^{phox})、丝裂原活化蛋白激酶 p38 亚基(p38)、胰岛素样生长因子 I 受体蛋白(IGFIR)、蛋白激酶 B(AKT)和 β-actin(1:500、1:500、1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:1 000,武汉三鹰生物技术有限公司)及磷酸化 AKT(p-AKT)和 p-p38(1:500、1:500,武汉 Abclonal 公司)于 4℃摇床孵育 12 h,第 2 天 TBST 室温漂洗 3 次,每次 5 min。室温孵育二抗(1:5 000,武汉三鹰生物技术有限公司)2 h,TBST 室温漂洗 3 次,每次 5 min。ECL(武汉塞维尔生物科技有限公司)发光显影。蛋白表达 ImageJ 软件分析灰度值,以 β-actin 为内参。

1.9 统计学处理

采用 SPSS22.0 软件进行数据分析和处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,检验水平 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 胰腺癌患者组织中 DCN 的表达比较

免疫组织化学染色结果显示,与健康组 $[(47.34 \pm 8.21)\%]$ 比较,PDAC 组 $[(36.81 \pm 11.15)\%]$ 和 PNET 组 $[(8.02 \pm 1.19)\%]$ 患者癌组织中 DCN 表达水平明显降低,差异有统计学意义 ($P=0.008, P=0.003$),见图 1A、B。Western blot 结果显示,PDAC 组 (3.23 ± 0.75) 和 PNET 组 (1.20 ± 0.37) 患者癌组织中 DCN 表达水平和明显低于与健康组 (5.22 ± 1.21) ,差异有统计学意义 ($P=0.009, P=0.002$),见图 1C、D。

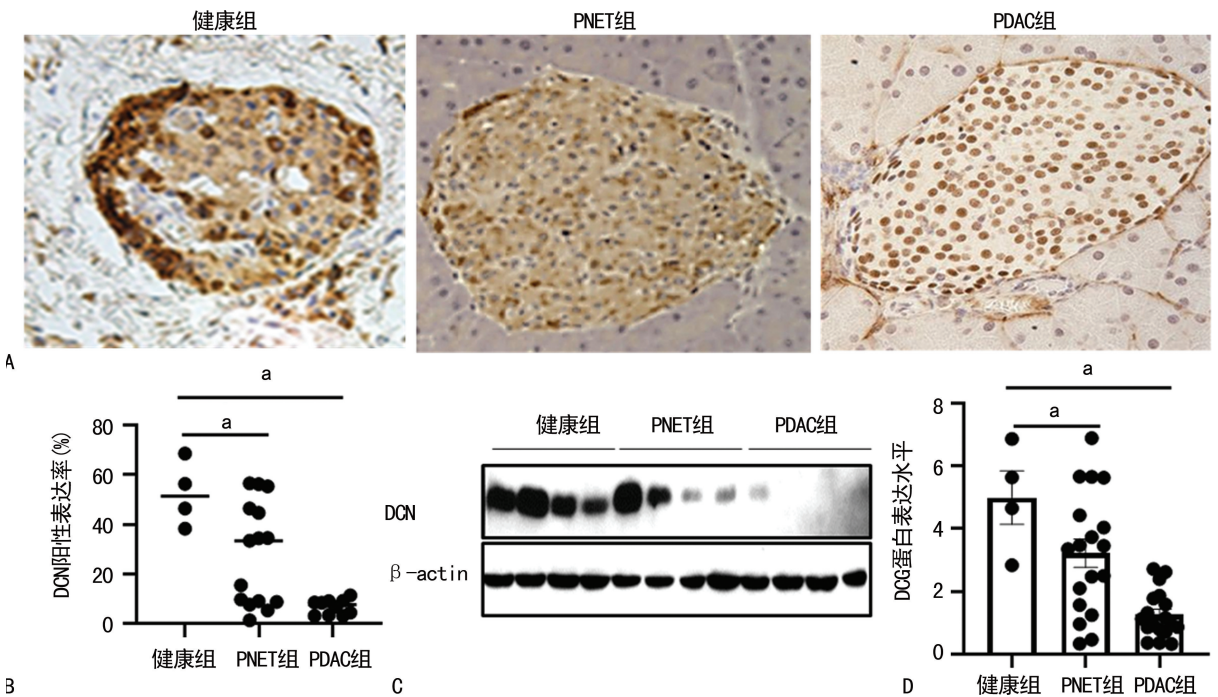
2.2 胰腺癌患者组织中线粒体功能比较

免疫荧光结果显示 PDAC 组和 PNET 组患者胰腺癌组织胰岛中 MFN2 表达水平分别为 $(22.64 \pm 8.34)\%$ 和 $(75.89 \pm 9.37)\%$,明显高于健康组胰腺组织 $(9.73 \pm 0.51)\%$ ($P=0.042, P=0.010$);DRP1 表达水平分别为 $(38.31 \pm 5.97)\%$ 和 $(19.93 \pm 7.21)\%$,明显低于健康组 $(50.23 \pm 11.90)\%$ ($P=0.039, P=0.022$),见图 2A、B。Western blot 结果显示,线粒体融合相关蛋白 MFN1、MFN2 和 OPA 在 PNET 组胰

腺癌组织 $(1.15 \pm 0.5, 1.68 \pm 0.2$ 和 $1.01 \pm 0.10)$ 和 PDAC 组胰腺癌组织 $(1.19 \pm 0.40, 0.79 \pm 0.30, 0.65 \pm 0.20)$ 中的表达水平明显高于健康组胰腺组织 $(0.56 \pm 0.20, 0.58 \pm 0.10, 0.25 \pm 0.05)$,其中 PNET 组 *vs.* 健康组 $P=0.045, 0.047, 0.041$;PDAC 组 *vs.* 健康组 $P=0.042, 0.049, 0.024$;线粒体分裂相关蛋白 DRP1、FIS1 和 MFF 在 PNET 组胰腺癌组织 $(0.82 \pm 0.12, 0.68 \pm 0.15, 0.95 \pm 0.13)$ 和 PDAC 组胰腺癌组织 $(0.79 \pm 0.34, 0.67 \pm 0.22, 1.85 \pm 0.49)$ 中的表达水平明显低于健康组胰腺组织 $(1.52 \pm 0.18, 1.98 \pm 0.20$ 和 $2.64 \pm 0.40)$,其中 PNET 组 *vs.* 健康组 $P=0.035, 0.021, 0.044$;PDAC 组 *vs.* 健康组 $P=0.039, 0.025, 0.047$ 。见图 2C、D。

2.3 DCN 对胰岛 β 细胞增殖的影响

在正常糖条件下,相较于 24 和 48 h 的 0 nmol/L DCN 组 (增殖倍数均为 1),100 nmol/L DCN 组 $(3.75 \pm 0.18, 3.96 \pm 0.16)$ 和 200 nmol/L DCN 组 $(2.21 \pm 0.18, 2.36 \pm 0.16)$ 的细胞增殖倍数明显增加 (24 h: $P=0.035, 0.016$;48 h: $P=0.045, 0.033$),见图 3A。在正常糖条件下,100 nmol/L DCN 组的 (5.22 ± 0.42) 细胞增殖倍数明显高于 0 nmol/L DCN 组 (3.96 ± 0.42) , $P=0.012$ 。在 HG 条件下,100 nmol/L DCN 组的 (2.16 ± 0.16) 细胞增殖倍数明显高于 0 nmol/L DCN 组 (1.36 ± 0.16) , $P=0.009$,见图 3B。



A:DCN 表达免疫组织化学代表图(200 $\times$);B:免疫组织化学统计分析图;C:DCN Western blot 图;D:Western blot 统计分析图;^a: $P<0.01$ 。

图 1 胰腺癌患者及健康者中核心蛋白聚糖表达分析

2.4 DCN 对胰岛 β 细胞凋亡的影响

在正常糖条件下,100 nmol/L DCN 组 $[(1.54 \pm 0.16)\%]$ 的 AnnexinV⁺PI⁻ 细胞比例与 0 nmol/L DCN 组 $[(1.25 \pm 0.15)\%]$ 比较无明显变化 ($P=$

0.165)。在 HG 条件下,100 nmol/L DCN 组 $(1.65 \pm 0.16)\%$ 的 AnnexinV⁺PI⁻ 细胞比例与 0 nmol/L DCN 组 $[(2.68 \pm 0.56)\%]$ 比较,差异无统计学意义 ($P=0.472$),见图 4A、B。

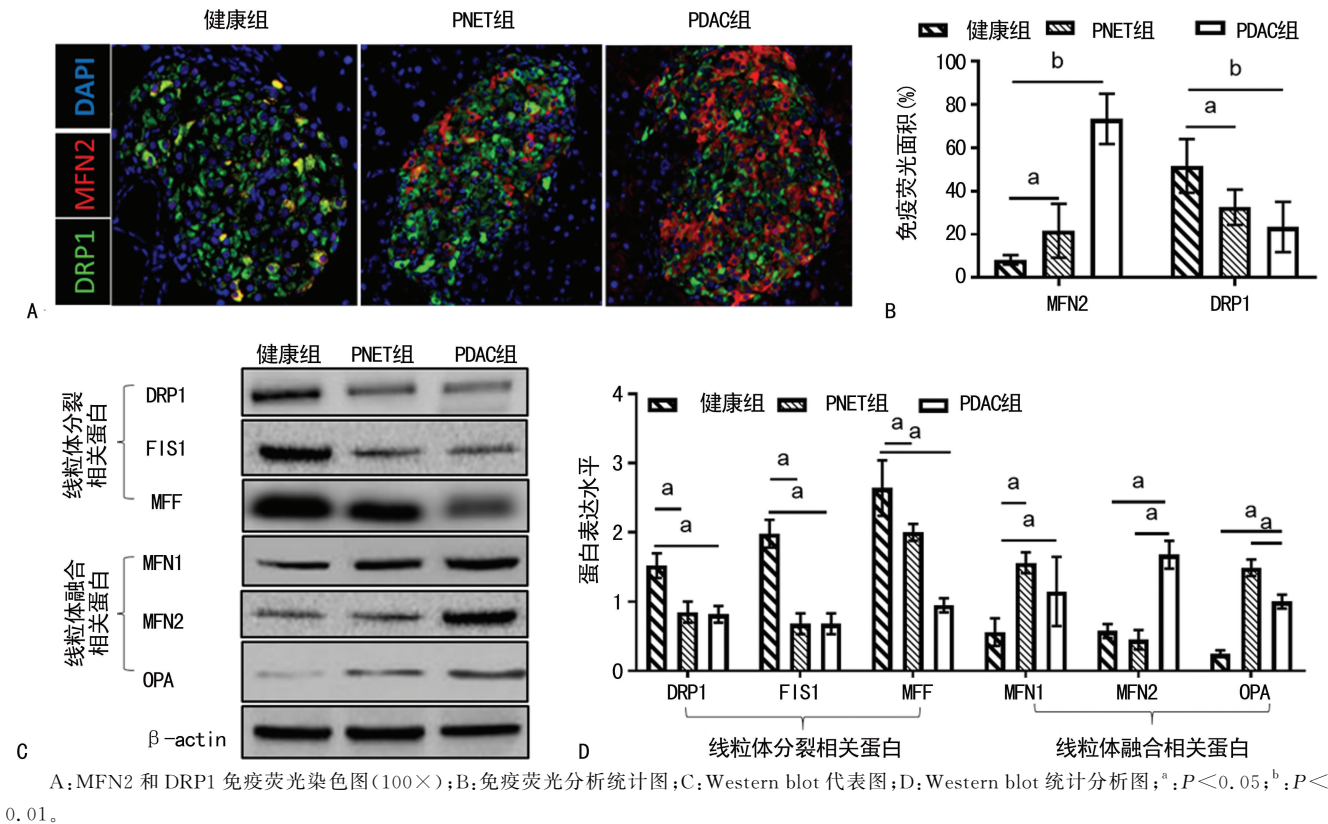


图 2 胰腺癌患者癌组织胰岛中线粒体融合和分裂情况变化

2.5 DCN 对胰岛 β 细胞胰岛素分泌和线粒体分裂、融合的影响

在正常糖和 HG 条件下,100 nmol/L DCN 组细胞培养上清液中的胰岛素分泌量分别为(4.65 $\pm$ 0.25) μ g/mL 和(1.75 $\pm$ 0.18) μ g/mL,分别高于正常糖条件下[(3.75 $\pm$ 0.25) μ g/mL]和 HG 条件下[(1.21 $\pm$ 0.18) μ g/mL]0 nmol/L DCN 组,差异有统计学意义($P=0.042$, $P=0.049$),见图 5A。在正常糖条件下,相较于 0 nmol/L DCN 组(0.85 $\pm$ 0.15、0.68 $\pm$ 0.15、1.32 $\pm$ 0.12),100 nmol/L DCN 组(2.58 $\pm$ 0.16、1.71 $\pm$ 0.16、2.50 $\pm$ 0.25)的线粒体分裂相关蛋白 DRP1、FIS1 和 MFF 表达水平明显增加($P=0.012$ 、0.034、0.013)。在正常糖条件下,相较于

0 nmol/L DCN 组(1.15 $\pm$ 0.15、1.68 $\pm$ 0.14、1.16 $\pm$ 0.12),100 nmol/L DCN 组(0.56 $\pm$ 0.20、0.58 $\pm$ 0.10、0.25 $\pm$ 0.05)的线粒体融合相关蛋白 MFN1、MFN2 和 OPA 表达水平明显减少($P=0.042$ 、 $P=0.015$ 、 $P=0.024$)。在 HG 条件下,相较于 0 nmol/L DCN 组(1.45 $\pm$ 0.43),100 nmol/L DCN 组(1.12 $\pm$ 0.18)的线粒体分裂相关蛋白 DRP1 表达水平明显减少($P=0.048$);在 HG 条件下,相较于 0 nmol/L DCN 组(2.45 $\pm$ 0.20、1.19 $\pm$ 0.10),100 nmol/L DCN 组(0.62 $\pm$ 0.26、0.82 $\pm$ 0.16)的线粒体融合相关蛋白 MFN2 和 OPA 表达明显减少,差异有统计学意义($P=0.014$ 和 $P=0.041$),见图 5B、C。

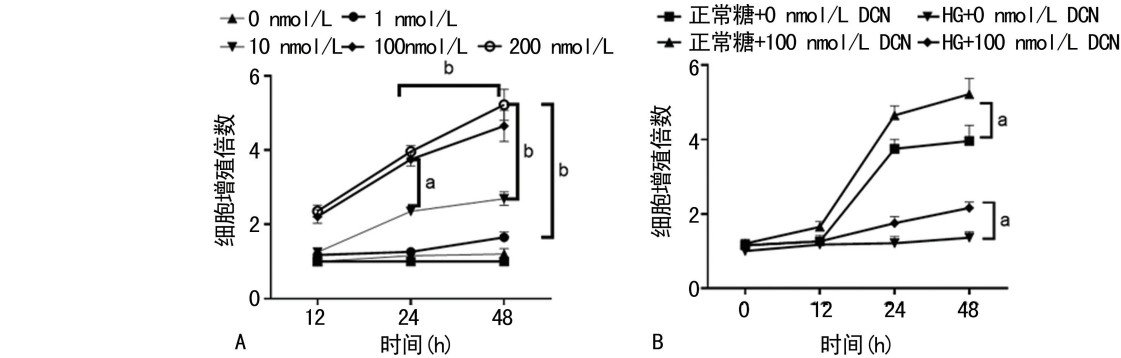
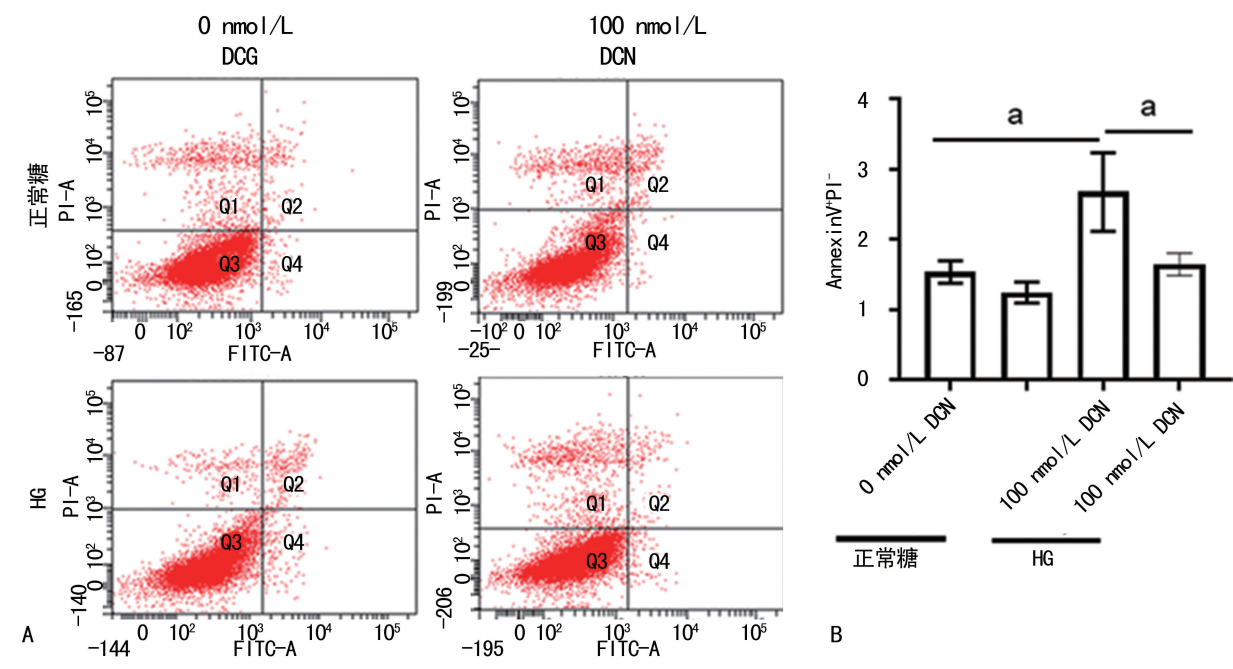
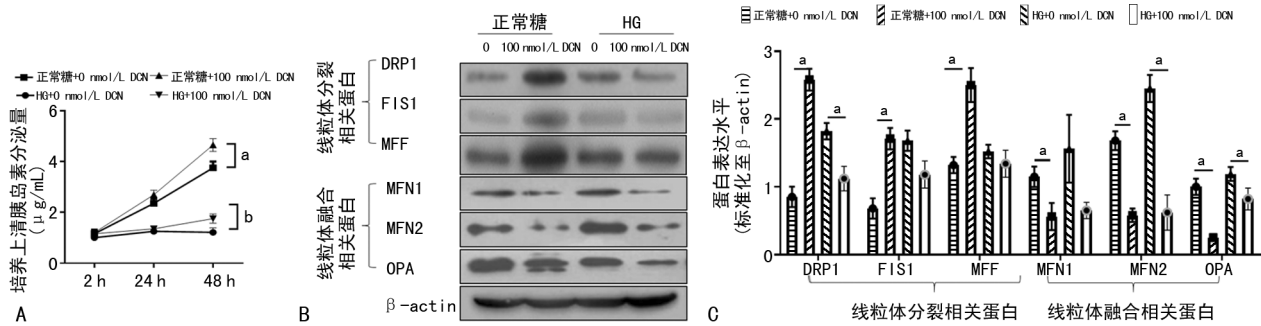


图 3 正常糖和 HG 条件下 DCN 对胰岛 β 细胞增殖的影响



A:流式细胞图; B:流式细胞统计图; ^a: $P<0.05$ 。

图 4 正常糖和 HG 条件下 DCN 对胰岛 β 细胞凋亡的影响



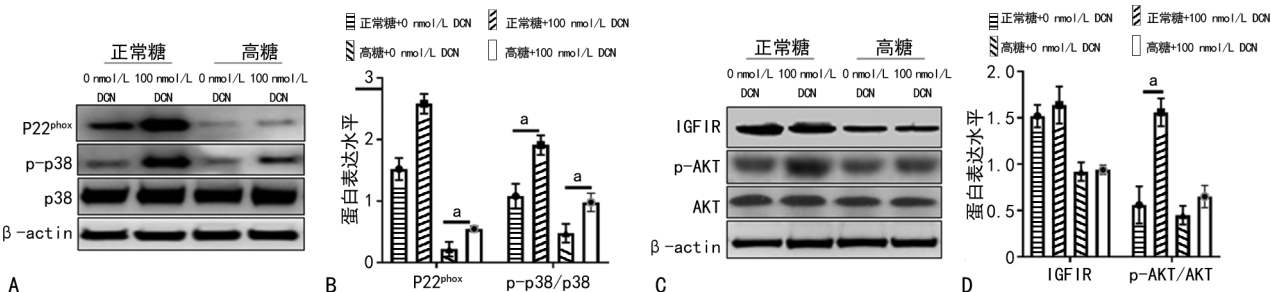
A,C:Western blot 图;B,D:Western blot 统计分析图; ^a: $P<0.05$; ^b: $P<0.01$ 。

图 5 正常糖和 HG 条件下 DCN 对胰岛 β 细胞胰岛素分泌和线粒体融合分裂的影响

2.6 DCN 对 P22^{phox}/MAPK 通路和 IGFIR/AKT 通路的影响

在正常糖和 HG 条件下,相较于 0 nmol/L DCN 组,100 nmol/L DCN 组的 P22^{phox} [正常糖条件: 1.52 ± 0.18 vs. 2.58 ± 0.16 , $P=0.031$; HG 条件: 0.22 ± 0.12 vs. 0.55 ± 0.05 , $P=0.024$] 和 p-p38 (正常糖条件: 1.08 ± 0.20 vs. 1.91 ± 0.16 , $P=0.024$; HG 条件: 0.48 ± 0.15 vs. 0.98 ± 0.15 , $P=0.025$) 表

达水平明显增加,差异有统计学意义,见图 6A、B。在正常糖和 HG 条件下,0 nmol/L DCN 组和 100 nmol/L DCN 组的 IGFIR 蛋白表达水平无明显变化 (正常糖条件: $P=0.961$; HG 条件: $P=0.879$),见图 6C、D;在正常糖下,100 nmol/L DCN 组 p-AKT 蛋白 (1.56 ± 0.15) 表达水平明显高于 0 nmol/L DCN 组 (0.56 ± 0.20),差异有统计学意义 ($P=0.019$),见图 6C、D。



A,C:Western blot 图;B,D:Western blot 统计分析图; ^a: $P<0.05$ 。

图 6 正常糖和 HG 条件下 DCN 对 P22^{phox}/MAPK 信号的影响

3 讨 论

近年来,越来越多的证据表明,重新编程的代谢可能在胰腺癌的发生发展、治疗和预后中起关键作用^[10]。研究报道,线粒体融合过程可以使胰腺癌破碎的线粒体正常化,并降低氧化磷酸化,从而抑制肿瘤生长和改善患者的存活率^[11]。在哺乳动物中,线粒体是众所周知的重要细胞器,线粒体的分裂融合在能量代谢和细胞存活中具有重要作用^[12]。且人重组 DCN 能够抑制胰腺癌细胞的生长^[13]。然而,胰腺癌中 DCN 的表达变化及 DCN 对胰岛细胞线粒体的分裂、融合的影响目前尚未见报道。

本研究证明了 PDAC 和 PNET 患者癌组织中 DCN 表达水平明显降低,并且,主要定位表达于胰岛部位。因此,DCN 可能与胰岛 β 细胞的生长和功能密切相关。其次,通过检测线粒体融合相关蛋白(MFN1、MFN2 和 OPA)和线粒体分裂相关蛋白(DRP1、FIS1 和 MFF)表达发现,PDAC 和 PNET 患者胰岛可能存在线粒体融合增加和线粒体分裂减少。这可能导致胰岛细胞生长和功能受损,胰岛素分泌不足,这与早期报道的 MFN2 抑制胰腺癌细胞的增殖和促进细胞凋亡结果一致^[14-15]。MFN2 将线粒体和内质网功能与胰岛素信号传导联系在一起,对于正常的葡萄糖稳态是必不可少的^[16]。本研究发现,DCN 可促进胰岛 β 细胞增殖,并在 HG 条件下,抑制胰岛 β 细胞凋亡。同时,DCN 在正常糖条件下促进线粒体分裂,抑制线粒体融合,而在 HG 条件下,DCN 抑制线粒体分裂和线粒体融合。提示,DCN 可能通过调控线粒体分裂融合影响胰岛 β 细胞生长和胰岛素释放。在 HG 中,胰岛 β 细胞呈现高度的胰岛素抵抗、糖耐受和 AKT 表达水平下调。因此,DCN 可能进一步下调 HG 环境线粒体分裂、融合。研究报道,DCN 可调控 P22^{phox}/MAPK 通路和 IGFIR/AKT 通路影响细胞生长和功能^[5,17]。本研究结果显示,在正常糖条件下,DCN 上调胰岛 β 细胞 P22^{phox}/MAPK 通路和 p-AKT 表达,但不影响 IGFIR 表达。在 HG 条件下,DCN 上调胰岛 β 细胞 P22^{phox}/MAPK 通路,但不影响 IGFIR/AKT 通路。说明,DCN 具有调控胰岛 β 细胞 P22^{phox}/MAPK 通路介导线粒体分裂、融合的作用,继而在正常糖和 HG 条件促进胰岛 β 细胞增殖。提示,在胰腺癌中下调的 DCN 可能参与调控线粒体分裂、融合影响胰岛 β 细胞功能,继而影响胰腺癌的发生发展。

综上所述,DCN 低表达于 PDAC 和 PNET 患者胰岛 β 细胞,且与胰岛 β 细胞线粒体融合分裂失衡密切相关。DCN 可激活 P22^{phox}/MAPK 通路,调控线粒体分裂、融合参与胰岛 β 细胞的胰岛素分泌和细胞增殖。从蛋白水平可知,DCN 促进正常糖条件下胰岛 β

细胞的线粒体分裂并抑制融合,同时,DCN 抑制 HG 条件下胰岛 β 细胞的线粒体分裂、融合,且 DCN 对正常糖和 HG 条件下均激活 P22^{phox}/MAPK 信号。但在 HG 条件下 DCN 介导的 P22^{phox}/MAPK 通路激活如何同时影响调控胰岛 β 细胞的线粒体分裂、融合尚需进一步研究。

参考文献

- [1] MIZRAHI J D, SURANA R, VALLE J W, et al. Pancreatic cancer [J]. *Lancet*, 2020, 395 (10242):2008-2020.
- [2] 陈钧泽, 齐元富. 中医药治疗胰腺癌应用研究进展[J]. *山东中医杂志*, 2021, 40(03):315-318.
- [3] HALBROOK C J, LYSSIOTIS C A. Employing Metabolism to improve the diagnosis and treatment of pancreatic cancer [J]. *Cancer Cell*, 2017, 31(1):5-19.
- [4] QIN C, YANG G, YANG J, et al. Metabolism of pancreatic cancer: paving the way to better anticancer strategies[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19 (1):50-69.
- [5] LAI J, CHEN F, CHEN J, et al. Overexpression of decorin promoted angiogenesis in diabetic cardiomyopathy via IGF1R-AKT-VEGF signaling[J]. *Sci Rep*, 2017(7):44-63.
- [6] MERLINE R, LAZAROSKI S, BABELOVA A, et al. Decorin deficiency in diabetic mice: aggravation of nephropathy due to overexpression of profibrotic factors, enhanced apoptosis and mononuclear cell infiltration[J]. *J Physiol Paris*, 2009, 60 (Suppl 4):5-13.
- [7] COMALADA M, CARDO M, XAUS J, et al. Decorin reverses the repressive effect of auto-craine-produced TGF-beta on mouse macrophage activation[J]. *J Immunol*, 2003, 170(9):4450-4456.
- [8] NEILL T, TORRES A, BURASCHI S, et al. Decorin induces mitophagy in breast carcinoma cells via peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha (PGC-1 alpha) and mitostatin[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289 (8):4952-4968.
- [9] SAINIO A O, JARVELAINEN H T. Decorin-mediated oncosuppression-a potential future adjuvant therapy for human epithelial cancers[J]. *Br J Pharmacol*, 2019, 176(1):5-15. (下转第 1284 页)

- [10] 蔡丙杰. LncRNA5322 在毛囊干细胞增殖, 分化及皮肤损伤修复中的作用及其机制[D]. 郑州: 郑州大学, 2018.
- [11] ZHU N, LIN E, ZHANG H, et al. LncRNA H19 overexpression activates Wnt signaling to maintain the hair follicle regeneration potential of dermal papilla cells[J]. *Front Genet*, 2020, 11:694.
- [12] ZHU Y B, WANG Z Y, YIN R H, et al. A lncRNA-H19 transcript from secondary hair follicle of Liaoning cashmere goat: Identification, regulatory network and expression regulated potentially by its promoter methylation[J]. *Gene*, 2018, 641:78-85.
- [13] ZHOU G, KANG D, MA S, et al. Integrative analysis reveals ncRNA-mediated molecular regulatory network driving secondary hair follicle regression in cashmere goats[J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1):222.
- [14] HU H, ZHANG Q, CHEN W, et al. MicroRNA-301a promotes pancreatic cancer invasion and metastasis through the JAK/STAT3 signaling pathway by targeting SOCS5[J]. *Carcinogenesis*, 2020, 41(4):502-514.
- [15] SHEN M, XU Z, XU W, et al. Inhibition of ATM reverses EMT and decreases metastatic potential of cisplatin-resistant lung cancer cells through JAK/STAT3/PD-L1 pathway[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1):1-14.
- [16] KHAN A Q, AHMED E I, ELAREER N, et al. Curcumin-mediated apoptotic cell death in papillary thyroid cancer and cancer stem-like cells through targeting of the JAK/STAT3 signaling pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(2):438.
- [17] SHIRAIWA K, MATSUSE M, NAKAZAWA Y, et al. JAK/STAT3 and NF- κ B signaling pathways regulate cancer stem-cell properties in anaplastic thyroid cancer cells[J]. *Thyroid*, 2019, 29(5):674-682.
- [18] DU L, CHANG H, XU W, et al. Effect of NMO-IgG on the interleukin-6 cascade in astrocytes via activation of the JAK/STAT 3 signaling pathway[J]. *Life Sci*, 2020, 258:118217.
- [19] FANG Y, ZHANG S, YIN J, et al. LINC01535 promotes proliferation and inhibits apoptosis in esophageal squamous cell cancer by activating the JAK/STAT 3 pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(7):3694-3700.

(收稿日期:2021-11-13 修回日期:2022-01-20)

(上接第 1278 页)

- [10] QIN C, YANG G, YANG J, et al. Metabolism of pancreatic cancer: paving the way to better anticancer strategies[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1):50-68.
- [11] YU M, NGUYEN N D, HUANG Y, et al. Mitochondrial fusion exploits a therapeutic vulnerability of pancreatic cancer[J]. *JCI Insight*, 2019, 5(16):65-79.
- [12] SABOUNY R, SHUTT T E. Reciprocal regulation of mitochondrial fission and fusion[J]. *Trends Biochem Sci*, 2020, 45(7):564-577.
- [13] KONINGER J, GIESE N A, DI MOLA F F, et al. Overexpressed decorin in pancreatic cancer: potential tumor growth inhibition and attenuation of chemotherapeutic action[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(14):4776-4783.
- [14] HU Y, WANG B, WANG L, et al. Mammalian STE20like kinase 1 regulates pancreatic cancer cell survival and migration through Mfn2 mediated mitophagy[J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(1):398-404.
- [15] PAN L, ZHOU L, YIN W, et al. MiR-125a induces apoptosis, metabolism disorder and migration impairment in pancreatic cancer cells by targeting Mfn2-related mitochondrial fission[J]. *Int J Oncol*, 2018, 53(1):124-136.
- [16] XUE R, MENG Q, LU D, et al. Mitofusin2 Induces cell autophagy of pancreatic cancer through inhibiting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Longevity OMAC*, 2018 (20):279-293.
- [17] DU S, SHAO J, XIE D, et al. Decorin inhibits glucose-induced lens epithelial cell apoptosis via suppressing P22^{phox}-p38 MAPK signaling pathway[J]. *PLoS One*, 2020, 15(4):e224251.

(收稿日期:2021-12-28 修回日期:2022-02-08)