

## • 临床研究 •

## PIEZO2 通过改变细胞功能促进胰腺癌细胞的发生发展

廖常希 蔡清河 江小杰 张如婧

**【摘要】 目的** 探讨压电型机械敏感离子通道元件 2 (piezoelectric type mechanosensitive ion channel component 2, PIEZO2) 对胰腺癌细胞发生发展的影响。**方法** 采用免疫组织化学技术检测胰腺癌与癌旁组织的 PIEZO2 阳性率; 将 PIEZO2 干扰片段转染到胰腺癌细胞 Panc-1 中, 通过实时荧光定量 PCR (qPCR) 和蛋白免疫印迹 (WB) 检测 PIEZO2 的转录水平及蛋白水平。以细胞计数试剂盒-8 (Cell Counting Kit-8, CCK8) 检测细胞增殖情况, transwell 法检测细胞的迁移侵袭能力。通过 Illumina HiSeq™ X Ten 进行 cDNA 文库构建并测序, 分析干扰 PIEZO2 后 Panc-1 细胞内差异基因并通过 GO 富集分析参与基因富集的相关通路。**结果** 胰腺癌组织中 PIEZO2 表达水平高于癌旁组织, 且高 PIEZO2 表达的胰腺癌患者总生存率较低。敲减 PIEZO2 基因后, qPCR 和 WB 结果显示 PIEZO2 的表达量较对照组减低, 差异具有统计学意义。敲减组的增殖、迁移、侵袭能力均低于对照组, 且差异具有统计学意义。对两组进行转录组分析发现, 两组分别获得 15 521, 15 325 个基因, 与敲减组相比, 对照组有 3 411 个差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 上调, 2 830 个 DEGs 下调, GO 富集分析发现 DEGs 基因主要富集于细胞内解剖结构、细胞连接和细胞外基质。**结论** 敲除 PIEZO2 可抑制细胞的增殖、迁移和侵袭, PIEZO2 通过调控细胞解剖结构、细胞连接和细胞外基质参与胰腺癌的发生发展, 靶向 PIEZO2 将是胰腺癌新的治疗策略。

**【关键词】** 胰腺癌细胞; PIEZO2; 转录组; Panc-1; 细胞功能

**【中图分类号】** R73 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2024)06-0021-04

胰腺癌是消化系统常见的恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>。由于早期检出率低, 胰腺癌患者总体 5 年生存率不足 11%<sup>[2]</sup>。胰腺癌细胞具有转移潜能, 导致预后不良, 影响治疗效果<sup>[3]</sup>。肿瘤细胞与周围微环境相互作用, 参与机械特性的改变, 影响癌症发生和传播<sup>[4-5]</sup>。压电型机械敏感离子通道元件 2 (piezoelectric type mechanosensitive ion channel component 2, PIEZO2) 是机械敏感的离子通道, 对膜的机械变形有反应<sup>[6]</sup>, 研究表明 PIEZO2 在多种肿瘤中参与机械异常性疼痛、增殖、迁移等多种生物过程<sup>[7-8]</sup>, 但 PIEZO2 在胰腺癌中的研究尚未见报道。本研究旨在分析 PIEZO2 在胰腺癌中的生物学功能和涉及的相关通路, 主要通过分析胰腺癌芯片中 PIEZO2 的表达情况, 随后通过在胰腺癌细胞中敲减 PIEZO2 观察细胞生物功能改变, 并通过转录组分析该改变涉及的通路, 以评估其在胰腺癌发生发展中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料 人胰腺癌细胞系 Panc-1 由 ATCC 细胞

库购买。Panc-1 细胞在含有 10% 胎牛血清 (FBS)、1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基中生长, 放置于含 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 的培养箱中培养。

### 1.2 方法

**1.2.1 免疫组织化学** 胰腺癌组织芯片 (直径 1.5 mm, 芯片厚度 4 μm) 购于 Biochip 公司, 纳入了 52 例伴有邻近正常组织的胰腺癌。兔抗人 PIEZO2 多克隆一抗 (Proteintech) 按 1:500 稀释, 免疫组化程序和染色评分遵循先前研究的方案<sup>[9]</sup>。

**1.2.2 构建干扰 PIEZO2 的胰腺癌细胞株** si-PIEZO2 购于 Sigma-Aldrich 公司, 在转染前 12 h 将 Panc-1 细胞接种到 6 孔板中。根据说明书, 使用 Lipofectamine 3000 (Invitrogen) 将终浓度为 100 nmol/L 的 siRNA 转染到细胞中。在转染后 48 h 后, 检测干扰效率。

**1.2.3 实时荧光定量 PCR (qPCR)** 采用 Trizol 法分离细胞中的总 RNA。用逆转录试剂盒 (Life) 将分离的总 RNA 逆转录合成 cDNA。参照 SYBR Green 试剂盒 (Life) 说明书, 配制反应体系上机

基金项目: 福建省卫生健康科技计划项目 (2020QNB051)

作者单位: 莆田学院附属医院, 莆田 351100

通信作者: 张如婧, Email: Zhangrujing26@163.com

DOI: 10.20148/j.fmj.2024.06.006

(引物序列见表 1)。下机后, 根据  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法对数据进行相对定量分析, 计算公式如下 (X 表示任意一个样本):  $\Delta\Delta C_t = (C_{t, Target} - C_{t, 内参}) - (C_{t, Target} - C_{t, 内参})_{Control}$ 。

表 1 用于 qPCR 检测的引物

引物	序列 (5'-3')
GAPDH-Forward	AATCCCATCACCATCTTAAC
GAPDH-Reverse	TGGACTCCACGACGTACTCA
PIEZO2 -Forward	CACCTGGCTACAACCTGCTCA
PIEZO2 -Reverse	CCCGATGTCAGGTACAAACA

**1.2.4 蛋白免疫印迹 (WB)** 收集细胞, 用放射免疫沉淀法裂解缓冲液 (RIPA) (Solarbio Science & Technology 公司) 裂解蛋白, 高速冷冻离心, 收集蛋白质样品, 加入蛋白缓冲液, 95 °C 水浴加热 5 min, 蛋白质充分变性; 检测蛋白浓度, 调整蛋白浓度等量上样, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺 (SDS-PAGE) 凝胶电泳, 转移到偏二氟乙烯膜 (PVDF), 用 5% 脱脂乳在室温下封闭膜 1 h。4 °C 孵育一抗过夜, 漂洗后加入二抗 (GAPDH 1 : 1 000, PIEZO2 1 : 1 000), 孵育 2 h, 漂洗后置于凝胶成像仪中自动曝光, 分析蛋白表达含量。

**1.2.5 细胞增殖实验** 将处于对数生长期的各实验组细胞用胰酶消化后, 稀释细胞到  $1 \times 10^5$  个/mL, 接种于 96 孔板继续培养。24 h 后, 每孔加入 10% CCK-8, 置于 37 °C 培养箱内继续培养 4 h 后置于酶标仪 450 nm 处检测每孔 OD 值。

**1.2.6 细胞迁移实验** 制备细胞悬液, 调整细胞数量至  $1 \times 10^5$  个/mL。取细胞悬液 100  $\mu$ L 加入 Transwell 小室上表面, 下室加入 600  $\mu$ L 含 20% FBS 的培养基培养, 24 h 后用棉签擦去上室细胞。移除上、下室的液体, 下室加入 600  $\mu$ L 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min, 移除多聚甲醛, 用棉签擦除未穿过膜的细胞, 下室加入 600  $\mu$ L 0.1% 结晶紫染色 15 min, 用 PBS 洗涤小室 2 次, 每组在显微镜下随机选取视野拍照, 观察细胞并计数。

**1.2.7 细胞侵袭实验** 4 °C 融化 Martrigel 基质胶, 用无血清培养基以 1 : 8 于冰上稀释 Martrigel 标准胶, 取 50  $\mu$ L 稀释的 Martrigel 胶包被 Transwell 上室, 4 °C 风干, 37 °C 使其彻底凝固后, 置于 24 孔板内。取 100  $\mu$ L 细胞悬液 (细胞数调整至  $1 \times 10^5$  个/mL) 加入 Transwell 小室上表面, 下室加入 600  $\mu$ L 含 20% FBS 的培养基培养, 24 h 后用棉签擦去上室细胞。其余步骤与迁移实验相同。

**1.2.8 细胞转录组测序** 将 Panc-1 细胞转染 48 h 后进行 cDNA 文库构建。使用 Illumina HiSeq™ X Ten 进行 cDNA 文库构建并测序。测序结果与小鼠参考基因组进行转录本拼接对齐的层次索引 2 (HISAT2) 比对。以每千碱基转录物的片段数测量基因表达水平, 该值  $\geq 0.5$  认为表达。组间差异表达基因 (DEGs) 进行聚类分析和功能注释。对于基因, 倍数差异 (fold change)  $\geq 1.0$  和控制错误发现率法 (FDR)  $< 0.05$  被认为具有统计学意义。对 DEGs 使用基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 数据库进行通路注释。

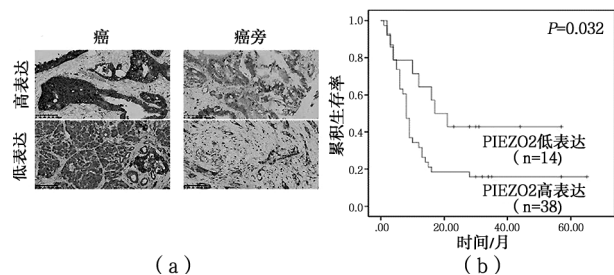
**1.3 统计学分析** 实验数据采用 SPSS 20.0 统计软件分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 计量资料两独立样本均值比较采用  $t$  检验。计数资料两样本间的比较采用  $\chi^2$  检验。 $P < 0.05$  被认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 PIEZO2 在胰腺癌中的表达情况** 与正常组织组相比, 胰腺癌组的 PIEZO2 表达升高 (73.1% 的癌组织呈现出高表达, 30.8% 的癌旁组织呈高表达,  $\chi^2 = 25.558$ ,  $P < 0.000 1$ ), 并且, PIEZO2 主要位于细胞膜和细胞质 (图 1a)。根据 PIEZO2 表达高低, 探讨 PIEZO2 表达与胰腺癌病理分级、神经/血管浸润、肿瘤浸润深度、淋巴结转移临床病理特征的关系, 数据显示 PIEZO2 表达高低与肿瘤浸润深度有关 ( $\chi^2 = 19.155$ ,  $P < 0.04$ ) (表 2)。生存曲线显示在胰腺癌组中低表达 PIEZO2 的患者生存期更长 (图 1b)。

表 2 PIEZO2 在胰腺癌组织中的表达水平与临床病理特征的关系 (n=52, 例)

因素	例数	PIEZO2 在胰腺癌组织中的表达		$\chi^2$ 值	P 值
		高表达 (n=38)	低表达 (n=14)		
病理分级					
I ~ II 级	27	18	9	2.320	0.677
II 级及以上	25	20	5		
神经/血管侵犯					
是	28	18	10	0.940	0.625
否	24	20	4		
肿瘤浸润深度					
T <sub>1</sub> ~T <sub>2</sub>	28	18	10	19.155	0.04
T <sub>3</sub> ~T <sub>4</sub>	24	20	4		
淋巴结转移					
是	31	25	6	3.625	0.459
否	21	13	8		

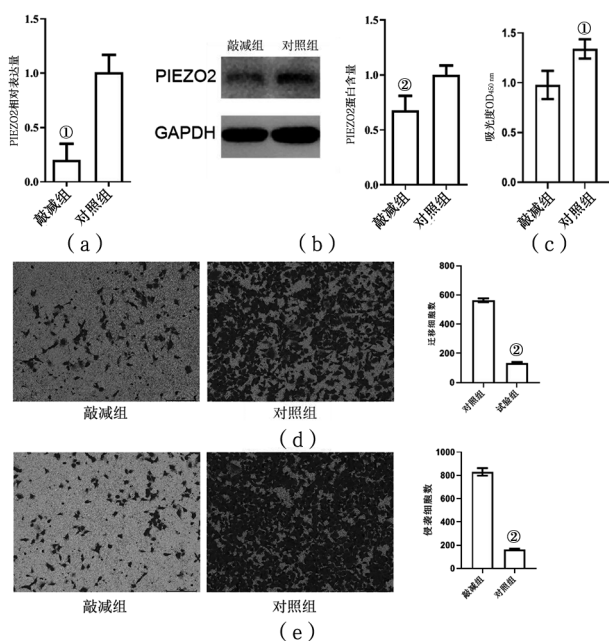


注：(a) 免疫组化检测胰腺癌与癌旁组织中的 PIEZO2 表达情况；(b) PIEZO2 表达高低与生存期的关系。

图 1 PIEZO2 在胰腺癌中的表达情况

## 2.2 PIEZO2 在胰腺癌细胞株中的生物学功能

qPCR 结果显示 PIEZO2 敲减组的 PIEZO2 相对表达量 ( $0.20 \pm 0.15$ ) 低于对照组 ( $1.01 \pm 0.16$ ), 差异具有统计学意义 ( $t = -6.474$ ,  $P = 0.003$ , 图 2a)。WB 结果表明敲减组的 PIEZO2 蛋白含量 ( $0.68 \pm 0.03$ ) 低于对照组 ( $1.00 \pm 0.02$ ) 且差异具有统计学意义 ( $t = -15.324$ ,  $P < 0.0001$ , 图 2b)。CCK8 结果显示敲减组的细胞增殖率 ( $0.98 \pm 0.14$ ) 低于对照组 ( $1.34 \pm 0.10$ ) 且差异具有统计学意义 ( $t = -4.551$ ,  $P = 0.003$ , 图 2c), 迁移侵袭实验结果显示敲减组的细胞迁移率 ( $134.00 \pm 6.56$ )、侵袭率 ( $164.67 \pm 4.73$ ) 均低于对照组 ( $563.33 \pm 13.32$ 、 $830.33 \pm 32.13$ ) 且差异具有统计学意义 ( $t = -50.097$ ,  $P < 0.0001$ , 见图 2d;  $t = -35.503$ ,  $P < 0.0001$ , 见图 2e)。



注：(a) qPCR 检测 PIEZO2 的相对表达量；(b) WB 检测 PIEZO2 蛋白含量；(c) CCK8 检测细胞增殖情况；(d) transwell 检测细胞迁移能力；(e) transwell 检测细胞侵袭能力。①表示  $P < 0.01$ , ②表示  $P < 0.001$ 。

图 2 敲减 PIEZO2 后 Panc-1 细胞功能学变化情况

## 2.3 转录组学分析干扰 PIEZO2 后胰腺癌细胞基因表达的变化

将敲减组和对照组细胞进行转录组测序, 结果分别得到 6 482 323 700, 6 530 213 600 bp 原始数, 整理后分别获得 42 899 819, 43 213 694 条序列, 经匹配基因, 分别获得 15 521, 15 325 个基因, 其中共有基因 14 399 个。火山图结果显示对照组与敲减组相比, 有 3 411 个 DEGs 上调, 2 830 个 DEGs 下调 (图 3a, 见封三)。对 DEGs 进行聚类分析绘制热图, 显示两组之间 DEGs 区分明显 (图 3b, 见封三)。GO 富集分析结果显示 DEGs 富集在细胞内解剖结构、细胞连接和细胞外基质的比例最高 (图 3c, 见封三)。

## 3 讨论

胰腺癌是一种高转移率和高死亡率的癌症。目前, 手术切除是胰腺癌最有效的治疗选择, 但延误诊断和无效的治疗方案等原因导致其发现时多为晚期, 而肿瘤生长的位置多在重要动脉周围和主动脉旁, 导致手术切除难度大<sup>[10]</sup>。因此, 寻找新的有效药物或新的潜在靶点治疗胰腺癌已成为当务之急。

最近的研究表明, PIEZO2 参与了癌症的进展。敲低 PIEZO2 减少胃癌细胞的迁移<sup>[11]</sup>。Etem 研究表明, PIEZO2 表达功能障碍可能通过引起增殖改变和血管生成参与膀胱癌的癌变<sup>[12]</sup>, PIEZO2 基因高甲基化是喉鳞状细胞癌的潜在生物标志物<sup>[13]</sup>。本研究结果显示, PIEZO2 在胰腺癌中高表达, 并与胰腺癌患者总生存率降低强相关, 敲低 PIEZO2 可抑制细胞迁移和侵袭。这结果表明 PIEZO2 在胰腺癌中的功能与在其他肿瘤中相似。敲低 PIEZO2 会影响内皮中的  $Ca^{2+}$  信号, 从而调节血管张力、动脉血压和血管生成<sup>[14]</sup>。此外,  $Ca^{2+}$  触发 Wnt11- $\beta$ -Catenin 信号通路, 激发肿瘤血管生成和胶质瘤细胞的侵袭潜能<sup>[15]</sup>。Wnt/ $\beta$ -catenin 通路在细胞增殖和分化中发挥重要作用<sup>[16]</sup>, Wnt/ $\beta$ -catenin 通路失调可导致肿瘤发生<sup>[17]</sup>。为了进一步探索 PIEZO2 与癌症相关的潜在分子机制, 本研究进行了转录组学分析, 发现细胞解剖结构、细胞连接和细胞外基质可能参与了 PIEZO2 与癌症阻断相关的分子机制。细胞机械感知涉及细胞骨架、细胞外基质和钙依赖性信号传导<sup>[18]</sup>。研究还发现 PIEZO1/ $[Ca^{2+}]_i$ /CALPAIN 信号通路参与了额外压力刺激下小气道紧密连接蛋白、紧密连接蛋白和封闭蛋白 18 的调控<sup>[19]</sup>。结构刚度、形态学、黏附性和细胞外基质刚度的机械改变在癌症的发生和发展中起着

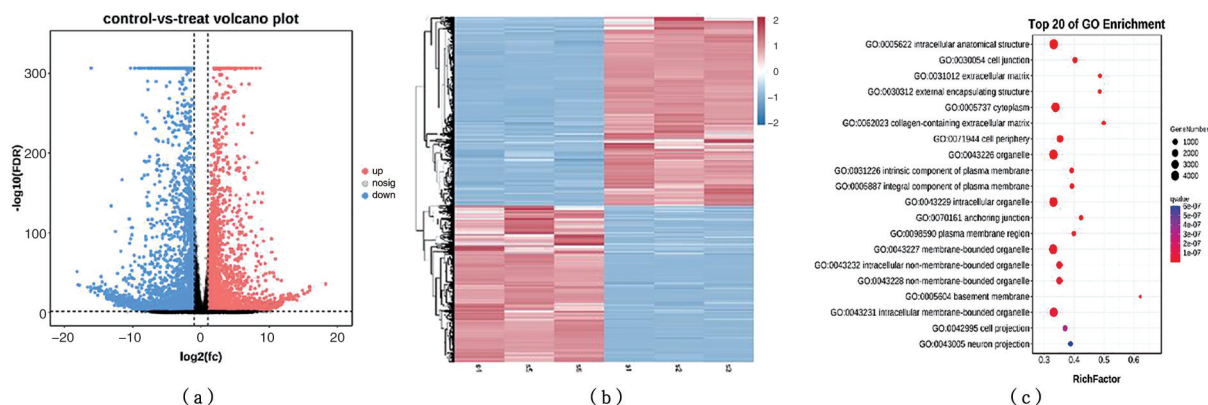
关键作用。因此, PIEZO2 相关的细胞骨架、细胞外基质和钙依赖性信号的变化可能有助于癌症的进展。本研究的亚组分析显示, II B 以上的神经/血管侵犯的胰腺癌患者 PIEZO2 表达较高, 总生存率明显较低。高 PIEZO2 表达的胰腺癌患者的神经和血管浸润表明 PIEZO2 与肿瘤分期有关。转录组结果表明, 细胞解剖结构、细胞连接和细胞外基质是癌症进展的关键因素, 这与我们对 PIEZO2 表达和癌症分期的亚组分析一致。综上, 敲除 PIEZO2 可抑制细胞的增殖、迁移和侵袭, PIEZO2 通过调控细胞解剖结构、细胞连接和细胞外基质参与胰腺癌的发生发展, 靶向 PIEZO2 将是胰腺癌新的治疗策略。

### 参考文献

- [1] SCHILD S E, VOKES E E. Pathways to improving combined modality therapy for stage III non-small-cell lung cancer [J]. *Ann Oncol*, 2016, 27 (4): 590-599.
- [2] SHERMAN M H, BEATTY G L. Tumor microenvironment in pancreatic cancer pathogenesis and therapeutic resistance [J]. *Annu Rev Pathol*, 2023, 18: 123-148.
- [3] MAKOHON-MOORE A, IACOBUZIO-DONAHUE C A. Pancreatic cancer biology and genetics from an evolutionary perspective [J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16 (9): 553-565.
- [4] DE FELICE D, ALAIMO A. Mechanosensitive piezo channels in cancer: focus on altered calcium signaling in cancer cells and in tumor progression [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12 (7): 1780.
- [5] CHEN M B, JAVANMARDI Y, SHAHREZA S, et al. Mechanobiology in oncology: basic concepts and clinical prospects [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2023, 11: 1239749.
- [6] DUAN M, JIA Y, HUO L, et al. Potentiation of PIEZO2 mechanically-activated currents in sensory neurons mediates vincristine-induced mechanical hypersensitivity [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2023, 13 (8): 3365-3381.
- [7] VERKEST C, SCHAEFER I, NEES T A, et al. Intrinsically disordered intracellular domains control key features of the mechanically-gated ion channel PIEZO2 [J]. *Nat Commun*, 2022, 13 (1): 1365.
- [8] HUANG Z, SUN Z, ZHANG X, et al. Loss of stretch-activated channels, PIEZO2, accelerates non-small cell lung cancer progression and cell migration [J]. *Biosci Rep*, 2019, 39 (3): BSR20181679.
- [9] SONG Y, CHEN J, ZHANG C, et al. Mechanosensitive channel Piezo1 induces cell apoptosis in pancreatic cancer by ultrasound with microbubbles [J]. *iScience*, 2022, 25 (2): 103733.
- [10] DAOUD A Z, MULHOLLAND E J, COLE G, et al. MicroRNAs in pancreatic cancer: biomarkers, prognostic, and therapeutic modulators [J]. *BMC Cancer*, 2019, 19 (1): 1130.
- [11] ZHANG Y C, YANG M, LU C D, et al. PIEZO2 expression is an independent biomarker prognostic for gastric cancer and represents a potential therapeutic target [J]. *Sci Rep*, 2024, 14 (1): 1206.
- [12] ETEM E, CEYLAN G G, ZAYDIN S, et al. The increased expression of Piezo1 and Piezo2 ion channels in human and mouse bladder carcinoma [J]. *Adv Clin Exp Med*, 2018, 27 (8): 1025-1031.
- [13] CHENG L, SHEN Z, ZHOU C. Promoter hypermethylation of PIEZO2 is a risk factor and potential clinical biomarker for laryngeal squamous cell carcinoma [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2017, 10 (12): 11635-11643.
- [14] SONKUSARE S K, BONEV A D, LEDOUX J, et al. Elementary  $Ca^{2+}$  signals through endothelial TRPV4 channels regulate vascular function [J]. *Science*, 2012, 336 (6081): 597-601.
- [15] YANG H, LIU C, ZHOU R M, et al. Piezo2 protein: A novel regulator of tumor angiogenesis and hyperpermeability [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (28): 44630-44643.
- [16] NUSSE R, CLEVERS H. Wnt/beta-catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities [J]. *Cell*, 2017, 169 (6): 985-999.
- [17] YU F, YU C, LI F, et al. Wnt/beta-catenin signaling in cancers and targeted therapies [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6 (1): 307.
- [18] CHENG D, WANG J, YAO M, et al. Joining forces: crosstalk between mechanosensitive PIEZO1 ion channels and integrin-mediated focal adhesions [J]. *Biochem Soc Trans*, 2023, 51 (5): 1897-1906.
- [19] ZHOU J, ZHOU X D, XU R, et al. The degradation of airway epithelial tight junctions in asthma under high airway pressure is probably mediated by Piezo-1 [J]. *Front Physiol*, 2021, 12: 637790.



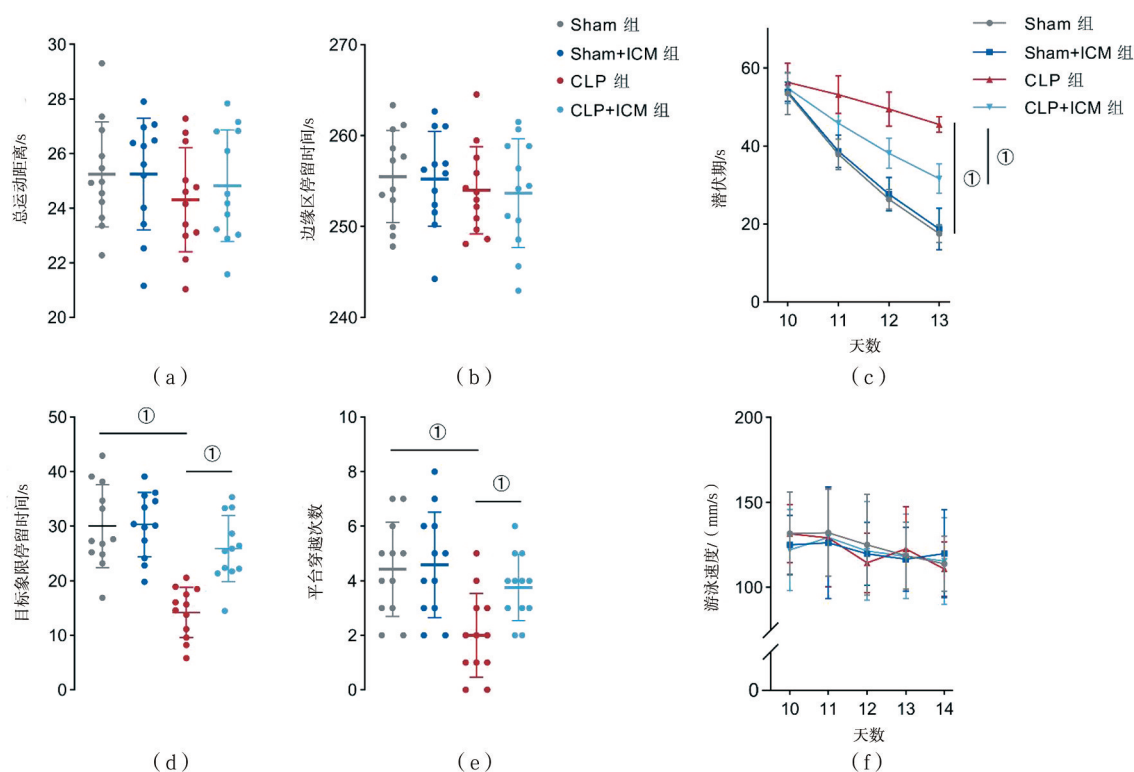
# PIEZO2 通过改变细胞功能促进胰腺癌细胞的发生发展 (详见正文第 21 页)



注：(a) 差异基因火山图；(b) 差异基因聚类热图：蓝色表示表达量下调，红色表示表达量上调，颜色深浅变化表示  $P$  值大小；(c) GO 富集气泡图：蓝色表示相较于对照组表达量下降，红色示相较于对照组表达量上升；纵坐标为 GO 条目，横坐标为富集因子；圈大小表示数量多少，圈颜色变化表示  $P$  值大小。

图 3 敲减 PIEZO2 后 Panc-1 细胞中的差异基因及相关通路富集分析

# 高迁移率族蛋白-1 通过 TLR4/eNOS 信号通路介导 脓毒症小鼠血脑屏障损伤 (详见正文第 67 页)



注：(a) 表示小鼠运动 OFT 总距离比较；(b) 表示小鼠 OFT 边缘区停留时间比较；(c) 表示小鼠 MWM 定位航行潜伏期比较；(d) 表示小鼠 MWM 空间探索目标象限停留时间比较；(e) 表示小鼠 MWM 空间探索穿越平台次数比较；(f) 表示小鼠 MWM 游泳速度比较；①表示  $P < 0.05$ 。

图 1 各组小鼠行为学实验比较