

## 层粘连蛋白 $\alpha 3$ 亚基(LAMA3)对胰腺癌上皮间质转化、侵袭和转移能力的影响

杨能红<sup>1</sup>, 任笠坤<sup>2</sup>, 田 舍<sup>1</sup>, 韩 民<sup>1</sup>, 李 铸<sup>1</sup>, 赵宇翔<sup>1</sup>, 刘 鹏<sup>1</sup>

1 贵州医科大学附属医院肝胆外科, 贵阳 550000

2 贵州医科大学临床医学院, 贵阳 550000

通信作者: 刘鹏, liupeng5061@126.com (ORCID: 0000-0003-0471-3836)

**摘要:** 目的 探索层粘连蛋白 $\alpha 3$ 亚基(LAMA3)对胰腺癌(PC)上皮间质转化(EMT)、侵袭和转移能力的影响。方法 综合分析肿瘤和EMT相关数据库,筛选出与PC相关的EMT基因LAMA3。通过qRT-PCR和Western Blot检测LAMA3在PC组织和细胞系中的表达水平,免疫荧光确定LAMA3在PANC-1细胞中的定位,Transwell实验评估LAMA3对PC细胞侵袭和迁移能力的影响。计量资料组间比较采用 $t$ 检验。结果 利用TCGA数据库筛选出3个EMT相关PC致癌因子LAMA3、AREG和SDC1。LASSO-Cox回归模型显示,LAMA3对PC预后影响最为显著(风险评分=0.256 1×LAMA3+0.043 1×SDC1+0.071 4×AREG)。Cox回归模型和列线图显示,LAMA3的高表达是PC不良预后的独立危险因素( $HR=1.32, 95\%CI: 1.07 \sim 1.62, P<0.01$ )。实验结果显示,相对于正常胰腺组织,LAMA3在PC组织中的表达显著上调。相对于HPDE细胞株,LAMA3在PC细胞株AsPC-1、BxPC-3、PANC-1、MIA PaCa-2、SW1990中的表达均有不同程度的升高,其中在PANC-1细胞中的表达最高。富集分析表明,LAMA3与EMT、胶原代谢、细胞外基质降解、TGF- $\beta$ 通路和PI3K通路等生物过程和信号通路相关。敲低LAMA3后,N-Cadherin、Vimentin和Snail的表达水平下降,而E-Cadherin的表达水平上升。Transwell实验结果显示,LAMA3敲低后,PANC-1细胞的侵袭和迁移能力明显减弱。结论 LAMA3在PC中高表达,促进PC细胞EMT、侵袭和迁移,可能是PC的新型诊断标志物和基因治疗靶点。

**关键词:** 胰腺肿瘤; 层粘连蛋白; 上皮-间质转化; 肿瘤浸润; 肿瘤转移

**基金项目:** 贵州省科技计划项目(黔科合基础-ZK[2024]一般230); 贵州省卫健委科学技术基金项目(gzkwj2024-373)

### Effect of laminin subunit $\alpha 3$ on epithelial-mesenchymal transition, invasion, and metastasis abilities of pancreatic cancer

YANG Nenghong<sup>1</sup>, REN Likun<sup>2</sup>, TIAN She<sup>1</sup>, HAN Min<sup>1</sup>, LI Zhu<sup>1</sup>, ZHAO Yuxiang<sup>1</sup>, LIU Peng<sup>1</sup>

1. Department of Hepatobiliary Surgery, The Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550000, China; 2. Clinical School of Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550000, China

Corresponding author: LIU Peng, liupeng5061@126.com (ORCID: 0000-0003-0471-3836)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of laminin subunit  $\alpha 3$  (LAMA3) on the epithelial-mesenchymal transition (EMT), invasion, and metastasis abilities of pancreatic cancer (PC). **Methods** A comprehensive analysis was performed for tumor- and EMT-related databases to identify the EMT genes associated with PC, especially LAMA3. The methods of qRT-PCR and Western blot were used to measure the expression level of LAMA3 in PC tissue and cell lines; immunofluorescence assay was used to determine the localization of LAMA3 in PANC-1 cells; Transwell assay was used to investigate the effect of LAMA3 on the invasion and migration abilities of PC cells. The  $t$ -test was used for comparison of continuous data between groups. **Results** The analysis of the TCGA database identified 3 EMT-related oncogenes for PC, i.e., LAMA3, AREG, and SDC1. The LASSO-Cox regression model showed that LAMA3 had the most significant impact on the prognosis of PC (risk score=0.256 1×LAMA3+0.043 1×SDC1+

0.071 4×AREG). The Cox model and nomogram showed that the high expression of LAMA3 was an independent risk factor for the poor prognosis of PC (hazard ratio=1.32, 95% confidence interval: 1.07—1.62,  $P<0.01$ ). Experimental results showed that there was a significant increase in the expression of LAMA3 in pancreatic cancer tissue compared with the normal pancreatic tissue. Compared with the HPDE cell line, there were varying degrees of increase in the expression of LAMA3 in pancreatic cancer AsPC-1, BxPC-3, PANC-1, MIA PaCa-2, and SW1990 cell lines, with the highest expression level in PANC-1 cells. The enrichment analysis showed that LAMA3 was associated with the biological processes and signaling pathways such as EMT, collagen metabolism, extracellular matrix degradation, the TGF- $\beta$  pathway, and the PI3K pathway. After the knockdown of LAMA3, there were significant reductions in the expression levels of N-Cadherin, Vimentin, and Snail, while there was a significant increase in the expression level of E-Cadherin. Transwell assay showed that there were significant reductions in the invasion and migration abilities of PANC-1 cells after the knockdown of LAMA3. **Conclusion** LAMA3 is highly expressed in PC and can promote the EMT, invasion, and migration of PC cells, and therefore, LAMA3 may be used as a novel diagnostic marker and a new therapeutic target for PC.

**Key words:** Pancreatic Neoplasms; Laminin; Epithelial-Mesenchymal Transition; Neoplasm Invasiveness; Neoplasm Metastasis

**Research funding:** Guizhou Provincial Science and Technology Program (QKH-JC2024-ZK [2024] 230); Guizhou Provincial Health Commission Science and Technology Fund Project (gzwkj2024-373)

胰腺癌(pancreatic cancer, PC)是一种具有高度侵袭性和致死率的恶性肿瘤,常在晚期才被诊断出来且治疗难度大,患者生存率极低<sup>[1]</sup>。PC细胞的强侵袭性和高度转移能力是治疗失败的主要原因之一。在PC扩散和转移过程中,上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)起着至关重要的作用<sup>[2]</sup>。EMT使上皮细胞转变为间质细胞,使其脱离原有组织结构,获得更强的运动和侵袭能力,从而显著加速癌细胞的扩散与转移<sup>[3]</sup>。

层粘连蛋白是一种由 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 链组成的异三聚体蛋白<sup>[4]</sup>,广泛存在于基底膜中,通过与细胞表面受体结合,在细胞外基质和细胞之间形成桥梁,帮助肿瘤细胞在体内扩散,在细胞黏附、迁移和信号传导等过程中发挥重要作用。层粘连蛋白 $\alpha$ 3亚基(laminin subunit alpha 3, LAMA3)是层粘连蛋白-332复合物的一部分,在组织结构支架的形成以及多种细胞功能中起着重要作用<sup>[5]</sup>,其突变或表达异常与多种疾病相关。例如,LAMA3基因缺陷与交界性表皮松解型大疱症有关,这种遗传性皮肤病表现为皮肤和黏膜脆弱、易损伤<sup>[6]</sup>。此外,LAMA3可以与整合素等多种细胞表面受体结合调节癌细胞活性,在肿瘤细胞侵袭和迁移中起着关键作用<sup>[7-8]</sup>。然而,LAMA3在PC中的作用尚不清楚。本研究旨在探讨LAMA3在调节PC细胞EMT、侵袭和迁移中的作用。

## 1 材料与方法

1.1 细胞 PC细胞株 AsPC-1、BxPC-3、PANC-1、MIA PaCa-2、SW1990及正常人胰腺导管上皮细胞 HPDE 购买

于中国科学院细胞库。通过细胞 STR 鉴定,无细菌、支原体污染。

1.2 药品与试剂 DMEM、RPMI-1640 培养基、青/链霉素均购自 Gibco 公司(美国);10% 胎牛血清购自 Gemini 公司(美国)。0.25% 胰蛋白酶购自上海奕杉生物科技有限公司(中国)。cDNA 逆转录试剂盒、SYBR<sup>®</sup>Premix ExTaq<sup>™</sup>购自 TaKaRa 公司(日本)。LAMA3、 $\alpha$ -Tubulin 引物及 LAMA3 小干扰 RNA 由上海生工生物工程有限公司(中国)设计并合成。RIPA 裂解液、5×蛋白上样缓冲液、SDS-PAGE 凝胶试剂盒、EDTA 抗原修复液、牛血清白蛋白购自北京索莱宝科技有限公司(中国)。ECL 化学发光试剂购自 Millipore 公司(美国)。Lipofectamine 3000 试剂盒购自 Invitrogen 公司(美国)。DAB 显色试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司(中国)。LAMA3、 $\alpha$ -Tubulin、E-Cadherin、N-Cadherin、Snail 和 Vimentin 抗体购自武汉三鹰生物工程公司(中国)。

1.3 仪器 NanoDrop 微量紫外分光光度计购自美国 Thermo Fisher 公司;倒置荧光显微镜及照相系统购自日本 Nikon 公司;化学发光成像系统和实时荧光定量 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.4 筛选 EMT 相关 PC 基因 首先,从癌症基因组图谱(the cancer genome atlas, TCGA)数据库<sup>[9]</sup>中获取并整理 TCGA-PAAD 项目的 RNAseq 数据及相应的临床资料。利用 R 软件(版本 4.2.1)中的“DESeq2”包对原始 Counts 矩阵进行差异表达分析。根据 LAMA3 表达量进行分组,定义标准为:表达量在 0~50% 为低表达组,表达量在 51%~100% 为高表达组,使用“survival”包进行批量

拟合 Cox 回归分析。整理并获取 298 个 PC 基因在 PC 中高表达,并引起较差的总生存期(overall survival, OS)、疾病特异性生存期(disease-specific survival, DSS)和进展生存期(progression-free interval, PFI)。在基因富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)数据库<sup>[10]</sup>中下载并整理了 200 个 EMT 相关基因。将 298 个 PC 基因与 200 个 EMT 相关基因取交集。

1.5 利用 LASSO 回归构建 PC 预后模型 基于 TCGA-PAAD 数据库的信息,将 LAMA3、AREG 和 SDC1 的表达数据纳入 LASSO 回归模型中进行特征选择。使用“glmnet”包的算法,应用 10 倍交叉验证来确定最优正则化参数( $\lambda$ ),以确保模型的稀疏性。选定的特征通过 LASSO 回归得到后,进一步利用“survival”包构建多因素 Cox 回归分析模型。使用“step”函数进行逐步回归,以选择最有意义的变量,进而确定最终的预后模型。利用 Log-rank 检验和单变量 Cox 回归分析评估该模型的预测性能。绘制 Kaplan-Meier 生存曲线,并计算风险比(HR)及 95%CI。利用“timeROC”包生成不同时间点的受试者操作特征曲线(ROC 曲线),以评估模型在 1 年、3 年和 5 年的预测准确性。

1.6 利用列线图构建 PC 预后模型 基于 TCGA 数据库进行单变量 Cox 回归分析,以评估每个参数在总生存率中的影响。将显著变量纳入多变量 Cox 回归模型。利用“forestplot”包,将上述 Cox 回归分析结果在森林图进行可视化。应用“rms”包构建列线图模型,预测患者总生存率。

1.7 探究 LAMA3 表达与 PC 患者临床预后的关系 从 TCGA 数据库和基因型-组织表达(genotype-tissue expression, GTEx)数据库<sup>[11]</sup>中获取 179 个 PC 组织样本和 171 个癌旁组织样本的 LAMA3 基因表达数据,以及这些患者的临床信息。从基因表达汇编(gene expression omnibus, GEO)数据库<sup>[12]</sup>中获取了四个微阵列表达数据集:GSE62452、GSE16515、GSE28735 和 GSE15471。使用“ggplot2”包分析 LAMA3 在 PC 中的表达情况及其与临床病理参数的关系。使用“survival”包进行比例风险假设检验和生存回归模型拟合,并利用“ggplot2”和“survminer”包对结果进行可视化处理。此外,从人类蛋白质图谱(human protein atlas, HPA)数据库<sup>[13]</sup>中获取 PC 和癌旁组织切片样本中 LAMA3 基因的蛋白表达情况和亚细胞定位信息。使用单因素 Cox 回归模型评估每个变量对生存时间的影响。使用多因素 Cox 回归模型,在控制其他变量的影响后,评估每个变量的独立作用,计算 HR、95%CI 和 P 值。

1.8 组织样本收集和免疫组织化学染色(IHC) 在贵州医科大学附属第一医院收集了 10 例 PC 患者的 PC 组织和癌旁组织。所有患者术前均未接受过放化疗、靶向或免疫治疗。收集的组织样本固定超过 24 h 后,进行梯度脱水、包埋、制备组织切片。切片经二甲苯和梯度乙醇脱蜡及水化处理,然后进行抗原修复。5%牛血清白蛋白封闭后,添加一抗孵育过夜。二抗孵育完成后,DAB 显色、苏木素核染。最后进行脱水、透明处理和封片。IHC 评分由两位病理学家根据染色强度和阳性细胞比例评估得出。染色强度按 4 分制评估(0 分:阴性,1 分:弱阳性,2 分:阳性,3 分:强阳性)。阳性细胞的占比按 5 分制评估:<1% 记 0 分,1%~25% 记 1 分,26%~50% 记 2 分,51%~75% 记 3 分,>75% 记 4 分。染色强度分数×阳性细胞比例分数=最终评分。

1.9 细胞培养 HPDE、PANC-1、MIA PaCa-2 细胞株培养于 DMEM 培养基,AsPC-1、BxPC-3、SW1990 细胞株培养于 RPMI 1640 培养基。培养基中均添加 10%FBS 和 1%青/链霉素。所有细胞均放置在 37 °C 5%CO<sub>2</sub>+95%空气的恒温培养箱中培养。

1.10 实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR) 提取总 RNA 后,将其逆转录获得 cDNA,然后进行 qRT-PCR 实验。利用实时荧光定量 PCR 仪进行检测。设置参数:95 °C 30 s,预变性;95 °C 5 s 变性,60 °C 30 s 退火,72 °C 20 s 延伸,40 个循环。反应得到的各个孔的 CT 值,以  $\alpha$ -Tubulin 为内参,检测各组细胞中 LAMA3 扩增效率,使用 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> 方法计算细胞 LAMA3 的相对表达量。

1.11 蛋白质印迹检测(Western Blot) 提取总蛋白后,将等量的蛋白样品经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离、转移到 PVDF 膜上。封闭完成后置于一抗中,4 °C 孵育过夜。二抗室温孵育 2 h, TBST 洗膜后,利用化学发光成像系统显影蛋白并保存图像。

1.12 细胞转染与分组 按照使用说明将 siRNA 使用无酶水溶解,配置成工作液。选用 LAMA3 内源性表达相对高的 PANC-1 细胞作为实验对象,当细胞密度生长至 60%~70% 时,利用相应的 siRNA 和 lipofectamine 3000 进行转染。将 PANC-1 细胞分为 4 个组:si-Control 组、si-LAMA3#1 组、si-LAMA3#2 组、si-LAMA3#3 组。使用 qRT-PCR、Western Blot 验证转染效率。

1.13 Transwell 侵袭和迁移实验 Transwell 迁移实验:根据分组将细胞悬液加入 Transwell 上室,同时加入 DMEM 培养基至 Transwell 小室的下室,然后将 Transwell 小室置于 37 °C 5%CO<sub>2</sub>+95%空气的恒温培养箱中培养。

24~48 h后取出小室,无菌棉签小心擦除上室内的细胞,0.3%结晶紫室温下染色10~15 min,PBS清洗后,将小室放入烘箱,烘干小室。在倒置显微镜下进行拍照和计数。在Transwell侵袭实验中,提前在小室内铺设基质胶(Matrigel胶:无血清DMEM=1:8)。上下振动以确保胶体铺匀,其余操作方法同Transwell迁移实验。

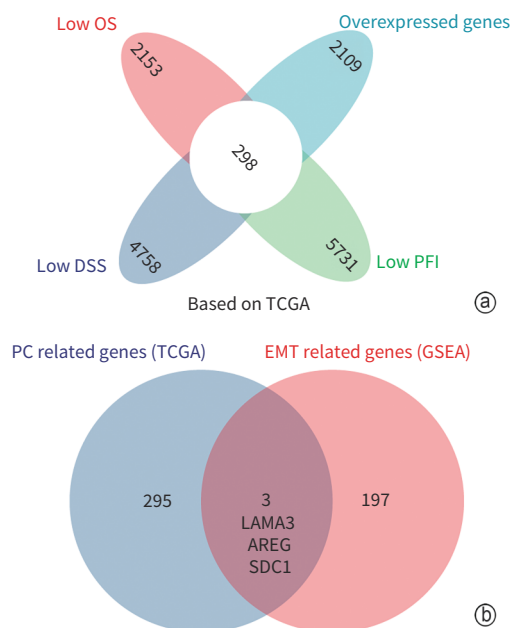
1.14 细胞免疫荧光实验 细胞爬片后,PBS清洗、甲醛溶液固定爬片30 min,PBST液浸洗爬片3次,加入适量0.5% TritonX-100室温破膜20 min。封闭后,加入LAMA3抗体置于4℃环境下孵育过夜。第二天加入同种属的荧光二抗室温避光孵育2 h。DAPI室温避光孵育10 min。荧光显微镜下观察,拍照记录荧光染色情况。

1.15 统计学方法 采用R软件(版本4.2.1)、GraphPad Prism 8.0或SPSS 25.0统计软件对数据进行分析。计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,2组间比较采用 $t$ 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 筛选EMT相关PC基因 为了筛选出与EMT相关的PC基因,首先利用TCGA-PAAD的数据,鉴定出在PC中过表达并导致患者预后不良的基因。结果显示,共有298个潜在的PC相关基因(图1a)。随后,将GSEA数据库中与EMT相关的200个基因与上述298个潜在的PC基因取交集。结果显示,LAMA3、AREG和SDC1可能是与EMT相关的PC基因(图1b)。

2.2 利用LASSO回归构建PC预后模型 为了研究上述3个基因对PC患者预后的影响,将LAMA3、AREG和SDC1纳入LASSO-Cox回归模型以筛选出最佳候选基因。结果显示,LAMA3、AREG和SDC1在LASSO-Cox模型中的对数 $\lambda$ 值均达到最佳区域(图2a、b)。将这3个基因作为特征构建基于OS的预测模型。风险评分=0.2561×LAMA3+0.0431×SDC1+0.0714×AREG。根据该模型绘制了风险评分分布图和Kaplan-Meier生存曲线图(图2c、d)。结果显示,患者的生存情况根据其风险评分显著分层。根据风险评分的高低,分为高风险评分组和低风险评分组。高风险评分组患者的OS显著降低,低风险评分组患者的OS显著增加(Log-rank检验: $P<0.05$ ,高风险组 $HR=2.195,95\%CI:1.431\sim 3.367$ )。时间相关的ROC曲线分析显示,该模型在1年、3年和5年时间点的ROC曲线下面积(AUC)分别为0.719、0.692和0.824(图2e),表明模型在这些时间点上具有较高的预测准确性。以上结果表明,以LAMA3、AREG和SDC1构建的预



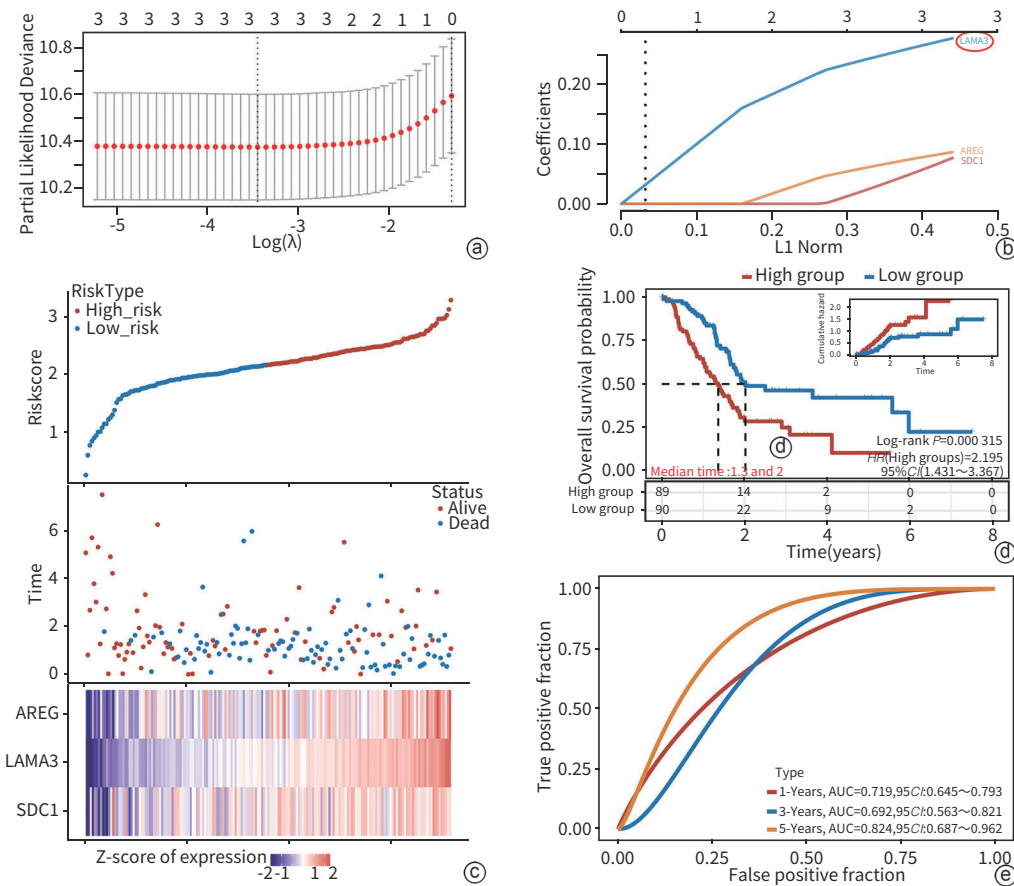
注:a,利用TCGA数据库筛选出298个PC致癌因子;b,将200个EMT相关基因与298个PC致癌因子取交集。

图1 LAMA3、AREG和SDC1为潜在的EMT相关PC基因  
Figure 1 LAMA3, AREG, and SDC1 identified as potential EMT-related genes in PC

后模型可以有效评估PC患者的预后风险,其中LAMA3的权重最高,对PC预后影响最为显著。

2.3 利用列线图构建PC预后模型 单因素Cox回归分析显示,AREG、LAMA3、SDC1的高表达和临床病理分级均与PC患者较差的预后相关( $P$ 值均 $<0.05$ ),对应的 $HR$ 分别为1.272 15、1.457 19、1.297 06和1.453 34(图3a)。进一步多因素Cox回归分析显示,LAMA3基因的高表达是PC的独立预后因素( $HR=1.32,95\%CI:1.07\sim 1.62,P<0.01$ )(图3b)。C指数为0.644( $P<0.05$ ),表明该模型具有较好的预后预测能力(图3c)。通过对患者1年和3年生存率预测发现,列线图模型预测生存率与实际观察到的生存率高度一致(图3d)。综上所述,LAMA3基因在预后预测中表现出明确且独立的预测作用,这进一步强化了LAMA3作为潜在预后标志物的价值。

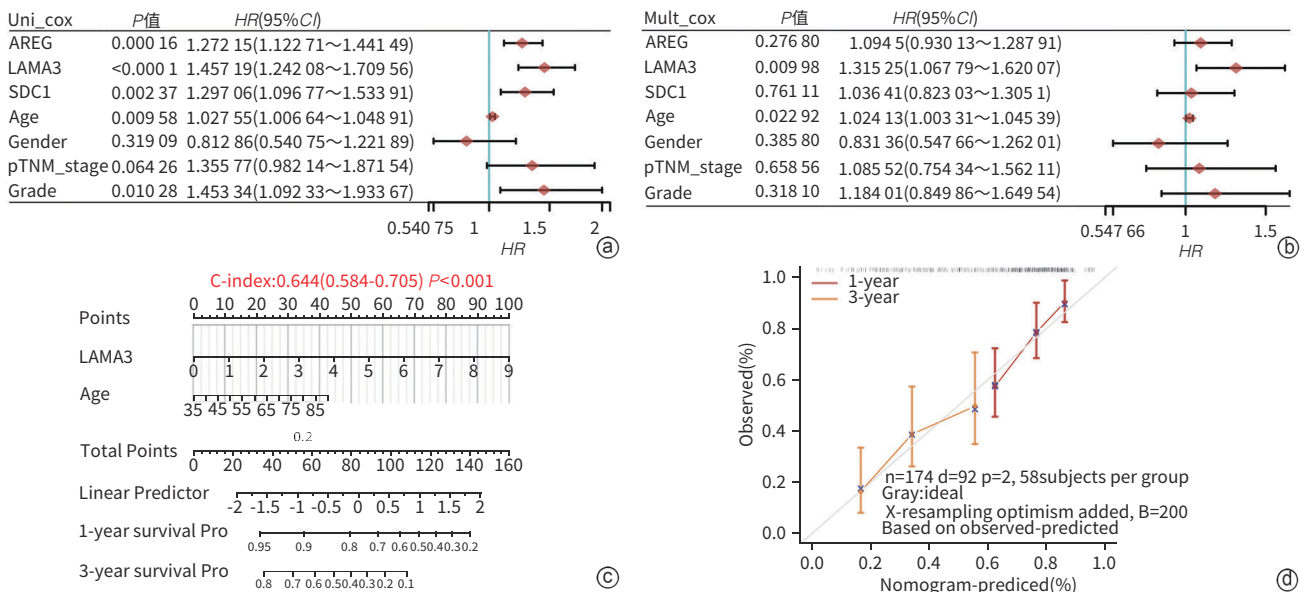
2.4 LAMA3与PC临床病理和预后之间的关系 进一步分析显示,LAMA3在PC中的表达水平显著升高(图4a~f)。此外,LAMA3表达水平越高,PC的T分期( $P<0.05$ )(图4g)、N分期(图4h)和M分期(图4i)均显示出晚期趋势。同时,II期PC患者LAMA3表达水平显著高于I期( $P<0.05$ )(图4j),IV期PC患者LAMA3表达水平高于III期(图4k)。LAMA3表达水平与PC患者的病理分级程度也呈正相关( $P<0.05$ )(图4l)。然而,由于PC病例数量有限,N1/N0、M1/M0以及Stage IV/Stage III之间未显示出显



注:a,b,基于TCGA-PAAD样本构建LASSO-Cox回归模型并通过交叉验证方法选择最优基因;c,该模型与PC患者预后风险的关系;d,高风险组和低风险组PC患者的预后比较;e,利用该预后模型构建的随时间变化的ROC曲线。

图2 基于LASSO回归构建LAMA3、AREG和SDC1的PC预后模型

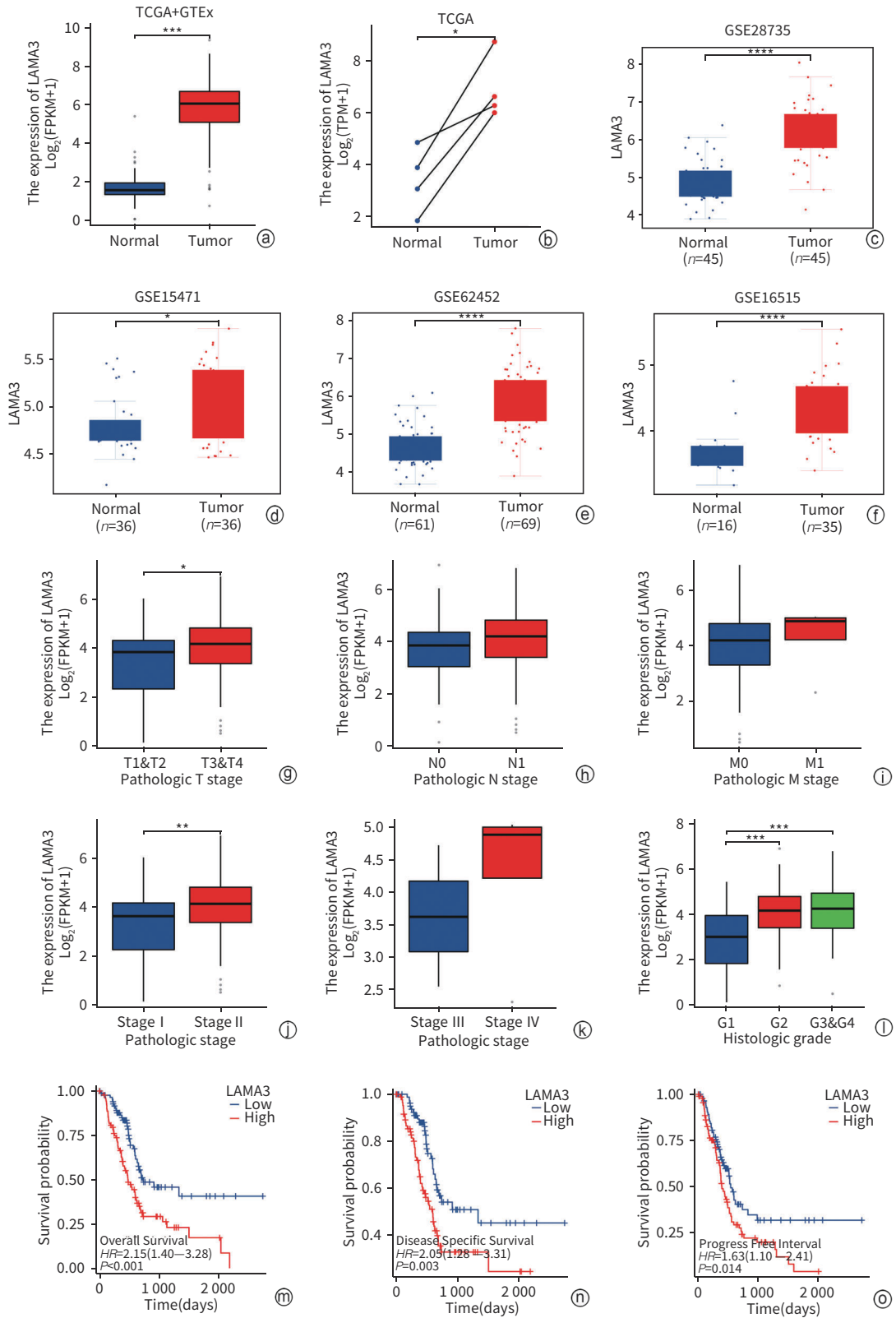
Figure 2 Prognostic Model for PC Constructed Based on LASSO Regression for LAMA3, AREG, and SDC1



注:a,b,单、多因素Cox回归分析研究AREG、LAMA3和SDC1表达与PC预后的关系;c,LAMA3对患者的1年和3年生存率的预测;d,列线图模型的预测生存率与实际观察到的生存率高度一致。

图3 基于列线图构建LAMA3、AREG和SDC1的PC预后模型

Figure 3 Prognostic model for PC constructed using a Nomogram for LAMA3, AREG, and SDC1



注: a~f, TCGA+GTEX 和 GEO 数据库显示 LAMA3 在 PC 组织中高表达; g~l, LAMA3 高表达与 PC 患者多种临床病理参数相关; m~o, LAMA3 高表达导致患者较差的 OS、DSS 和 PFI。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , \*\*\*\* $P<0.0001$ 。

图 4 LAMA3 表达与 PC 患者临床病理及预后的关系

Figure 4 The relationship between LAMA3 expression and the clinicopathological features and prognosis of PC patients

著的统计学差异。LAMA3基因高表达与患者的不良OS(图4m)、DSS(图4n)和PFI(图4o)相关( $P$ 值均 $<0.05$ )。同时,单因素Cox回归分析示,临床分期、病理分级和LAMA3的表达水平与PC患者较差的OS相关( $P$ 值均 $<0.05$ );多因素Cox回归分析示,LAMA3的高表达和临床N分期与PC患者较差的OS相关( $P<0.05$ )(表1)。综上所述,LAMA3的高表达与PC患者的临床分期、病理分级及预后密切相关,LAMA3可能是PC中有潜在研究价值的致癌因子。

**2.5 LAMA3在PC组织和细胞系中高表达** 收集10例PC组织及配对的癌旁胰腺组织进行IHC实验发现,LAMA3在PC组织中的表达水平高于配对的癌旁组织(图5a、b),这与HPA数据库中的信息一致(图5c)。此外,与HPDE细胞相比,LAMA3在几种PC细胞系中的表达均显著增加,其中,PANC-1细胞的LAMA3表达水平最

高(图5d、e)。因此,后续选择PANC-1细胞进行实验。

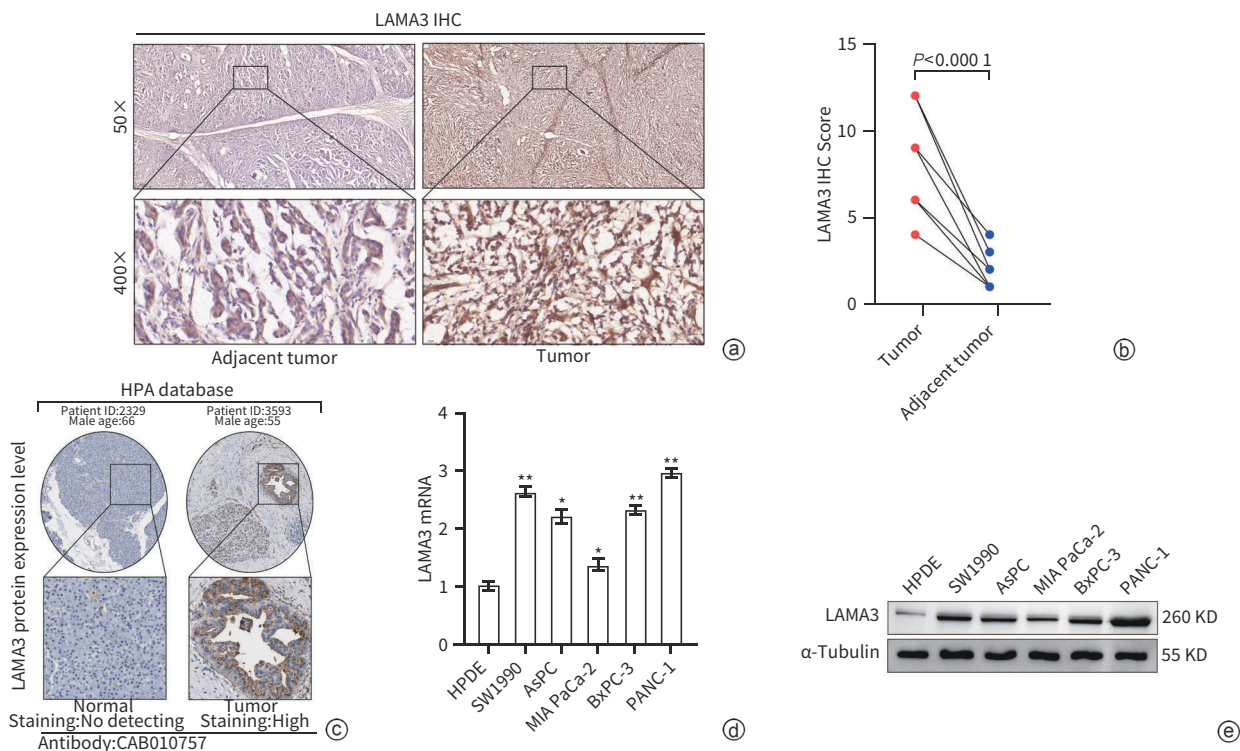
**2.6 LAMA3的亚细胞定位情况** 在PANC-1细胞中进行免疫荧光实验以了解LAMA3基因的亚细胞定位情况。结果显示,在PANC-1细胞中,LAMA3主要定位于细胞质(图6a)。这一观察与HPA数据库中A-431细胞LAMA3的亚细胞定位数据一致(图6b~g)。红、蓝、绿三色通道合并后的结果显示,LAMA3在细胞内的定位主要集中在内质网区域。既往研究显示,LAMA3在细胞外基质中发挥重要作用,包括参与细胞与细胞外基质的黏附、信号传导和细胞迁移等过程<sup>[14]</sup>。上述结果表明,LAMA3可能主要在内质网中完成自身的合成、折叠和组装,随后被分泌到细胞外基质中,发挥其功能。

**2.7 LAMA3调节PC细胞EMT、侵袭和迁移能力** 首先,利用TCGA数据库中的信息,通过ssGSEA算法,计算每条通路上LAMA3的富集分数,得到LAMA3和EMT相

表1 多因素Cox回归分析临床特征和LAMA3表达与PC预后的关系

Table 1 Multivariate Cox regression analysis of clinical characteristics and LAMA3 expression in relation to prognosis of pancreatic cancer

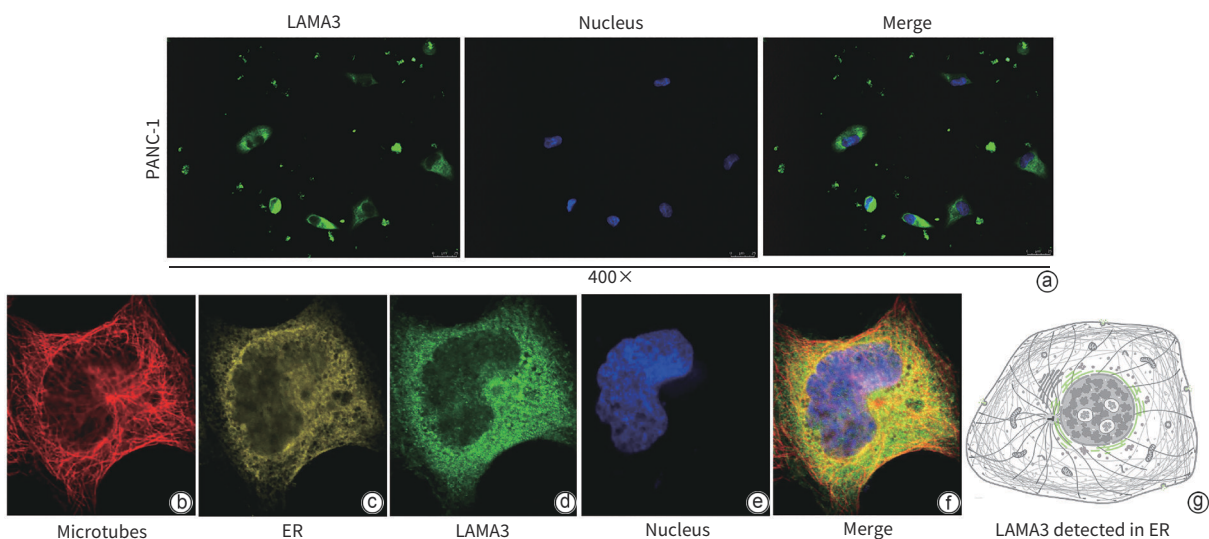
特征	例数	单因素分析		多因素分析	
		HR(95%CI)	P值	HR(95%CI)	P值
性别					
女	80				
男	99	0.813(0.541 ~ 1.222)	0.319		
年龄					
≤65岁	94				
>65岁	85	1.285(0.853 ~ 1.937)	0.230		
T分期					
T1 & T2	31				
T3 & T4	146	2.035(1.079 ~ 3.838)	0.028	2.225(0.808 ~ 6.126)	0.122
N分期					
N0	50				
N1	124	2.161(1.287 ~ 3.627)	0.004	2.343(1.192 ~ 4.607)	0.014
M分期					
M0	80				
M1	5	0.773(0.185 ~ 3.227)	0.724		
临床分期					
Stage I	21				
Stage II	147	2.349(1.077 ~ 5.123)	0.032	0.367(0.086 ~ 1.563)	0.175
Stage IV & III	8	1.464(0.374 ~ 5.734)	0.585	0.346(0.059 ~ 2.026)	0.239
病理分级					
G1	31				
G2	96	1.974(1.016 ~ 3.834)	0.045	1.586(0.798 ~ 3.152)	0.188
G3 & G4	50	2.586(1.288 ~ 5.192)	0.008	1.919(0.948 ~ 3.883)	0.070
LAMA3					
低表达	89				
高表达	90	2.145(1.401 ~ 3.284)	< 0.001	1.805(1.155 ~ 2.821)	0.010



注: a、b, IHC 实验证实 LAMA3 在 PC 组织中表达升高; c, HPA 数据库示 LAMA3 在 PC 组织中高表达; d、e, qRT-PCR 和 Western Blot 实验证实 LAMA3 在 PC 细胞系中表达上调。与 HPDE 比较, \* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.0001$ 。

图 5 LAMA3 在 PC 组织和细胞系中的表达情况

Figure 5 Expression of LAMA3 in PC tissues and cell lines



注: a, 免疫荧光实验显示 LAMA3 在 PANC-1 细胞中的定位情况 ( $\times 400$ ); b ~ g, HPA 数据库显示 LAMA3 在细胞内主要定位于内质网中 (HPA009309: A-431 cell)。

图 6 LAMA3 的亚细胞定位情况

Figure 6 Subcellular localisation of LAMA3

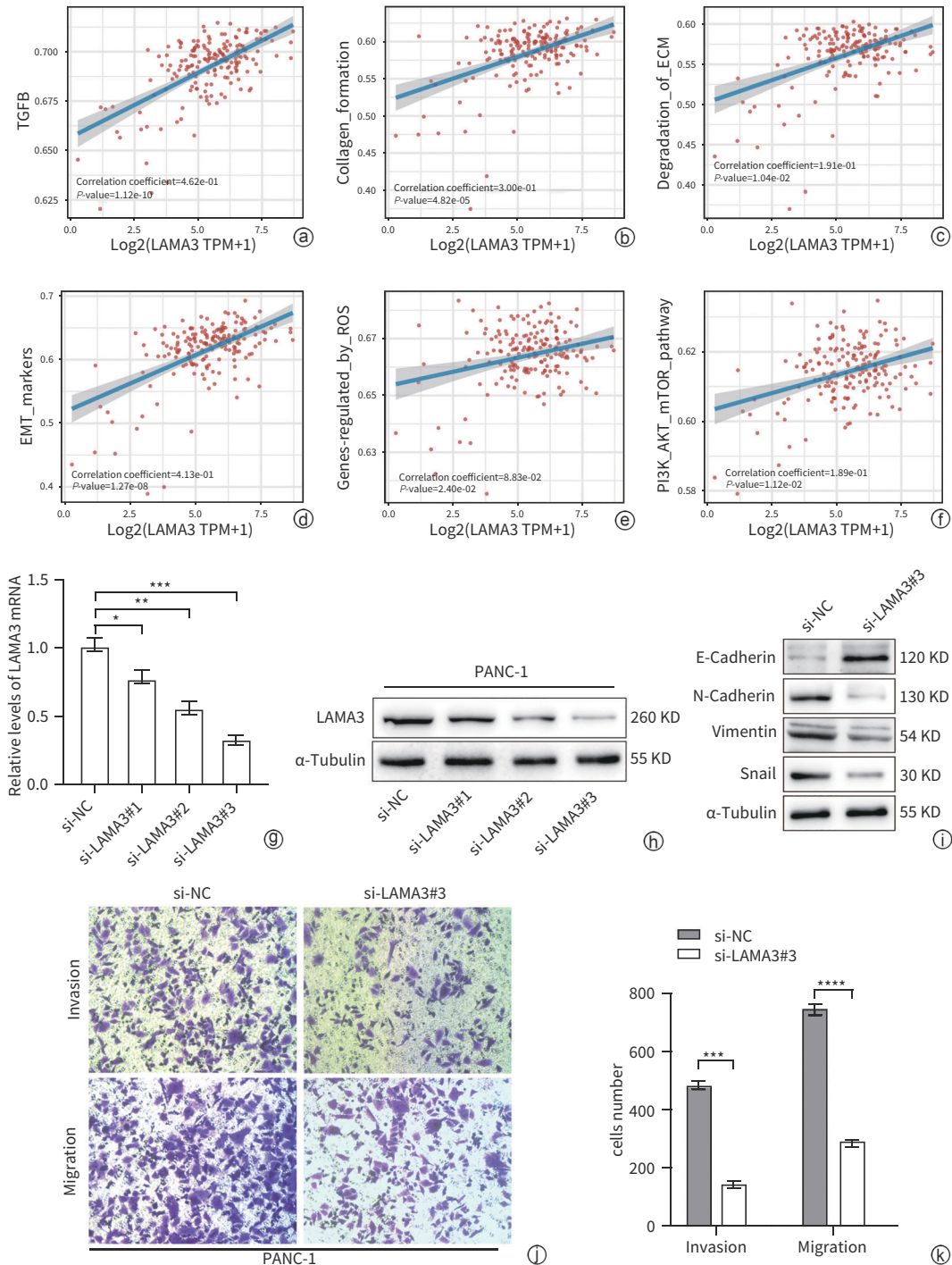
关通路之间的联系 (图 7a ~ f)。结果表明, LAMA3 与 EMT、胶原代谢、细胞外基质降解等相关。TGF- $\beta$  通路、PI3K 通路在 EMT 过程中扮演关键的调控角色, LAMA3 基因与这些通路存在明显的正相关性。这些结果初步

提示 LAMA3 可能参与 PC 细胞的 EMT、侵袭和迁移。其次, 设计 3 条小干扰 RNA 并转染至 PANC-1 细胞中, 以研究 LAMA3 对 PC 细胞的调控作用。结果表明, si-LAMA3#3 的沉默效果最好 (图 7g、h)。LAMA3 敲低后,

N-Cadherin、Vimentin 和 Snail 的表达水平下降, E-Cadherin 的表达水平升高(图 7i), PANC-1 的侵袭和迁移能力减弱(图 7j、k)。综上所述, LAMA3 可能通过调控 EMT 从而影响 PC 细胞的侵袭和迁移能力。

### 3 讨论

早期 PC 通常缺乏明显症状, 患者往往在诊断时已处于晚期, 导致治疗变得更加复杂和困难<sup>[15]</sup>。传统治疗



注: a~f, ssGSEA 分析显示 LAMA3 与 EMT 标志基因、胶原代谢、细胞外基质降解、活性氧代谢、TGF- $\beta$  通路、PI3K 通路存在明显的正相关性; g~h, 小干扰 RNA 转染效率的验证; i, 敲低 LAMA3 使 EMT 间质标志物表达降低, 上皮标志物表达升高; j~k, 敲低 LAMA3 显著抑制 PANC-1 的侵袭和迁移能力。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

图 7 LAMA3 对 PC 细胞 EMT、侵袭和迁移的调控作用

Figure 7 The regulatory role of LAMA3 in EMT, invasion, and migration of PC cells

方式在晚期PC中的效果有限<sup>[16]</sup>。为了有效应对这一重大挑战,探索可靠的PC生物标志物和治疗靶点,并深入揭示其疾病机制不仅有助于早期诊断,还为个性化治疗提供了新的方向。

EMT是肿瘤转移过程中的一个关键生物学过程。在EMT过程中,上皮细胞失去极性和紧密连接,获得了间质细胞的迁移和侵袭特性<sup>[17]</sup>,这种转变使肿瘤细胞能够突破基底膜,侵入周围组织和血流,进而在身体其他部位形成转移灶。此外,EMT还与肿瘤细胞的干细胞特性和耐药性密切相关<sup>[18]</sup>。这些特性不仅提高了肿瘤细胞的恶性程度,还使其在应对化疗和靶向治疗时更具抵抗力。因此,EMT在肿瘤的多阶段进程中起到了不可或缺的推动作用。在PC的发展过程中,EMT被认为是其高度侵袭性和早期转移能力的重要机制<sup>[19-20]</sup>。EMT过程中的关键调控因子,如Twist1<sup>[21]</sup>,能够促进EMT过程,加速癌细胞迁移和侵袭。其他EMT相关因子如Snail1<sup>[22]</sup>和Vimentin<sup>[23]</sup>在PC中也表达上调,与患者的不良预后显著相关。这表明在PC进展中EMT显著影响其生物学行为和临床结局。因此,探索EMT在PC中的调控机制变得尤为重要。

基于TCGA数据库的研究结果显示,LAMA3、AREG和SDC1可能是PC中调控EMT过程的关键靶点。相比之下,EMT相关基因LAMA3可能是PC预后中最关键的靶点。层粘连蛋白是一个庞大的异源三聚糖蛋白家族,由5条 $\alpha$ 链(LAMA1~5)、3条 $\beta$ 链(LAMB1~3)和3条 $\gamma$ 链(LAMC1~3)的不同组合组装成交叉样结构<sup>[24]</sup>。例如,层粘连蛋白-332由 $\alpha 3$ 、 $\beta 3$ 和 $\gamma 2$ 链组成,与整合素 $\alpha 6\beta 1$ 结合后,可导致p190 RhoGAP的酪氨酸磷酸化,从而刺激侵袭所需的突起形成和对细胞外基质的降解<sup>[25]</sup>。大量证据表明,层粘连蛋白的异常表达与多种癌症的生物学特征和临床预后相关。Ning等<sup>[26]</sup>发现,LAMA3与METTL3互作,促进口腔鳞状细胞癌的恶性进展。沉默LAMA3可以抑制胆管癌细胞的增殖、迁移和EMT过程<sup>[27]</sup>。此外,LAMA3的表达水平和碱基突变可以改变层粘连蛋白的水平,从而对卵巢癌的发病和预后产生影响<sup>[28]</sup>。然而,LAMA3在PC中的作用尚不清楚。通过实验表明,LAMA3在PC组织和细胞系中高表达,在细胞内的定位主要集中在内质网区域,这表明LAMA3可能主要在内质网中完成自身的合成、折叠和组装,随后被分泌到细胞外基质中,参与细胞与细胞外基质的黏附、信号传导和细胞迁移等过程。进一步的ssGSEA分析显示,LAMA3与EMT相关通路存在显著正相关。通过Western Blot实

验发现,敲低LAMA3使EMT间质标志物的表达增加,而上皮标志物的表达减少,抑制了PC细胞的侵袭和迁移能力。因此,LAMA3可能通过影响EMT过程,调控PC细胞的侵袭和迁移能力,是一个潜在的基因治疗靶点。

虽然本研究揭示了LAMA3在PC中的重要性,但依然仍存在一些局限性。首先,本研究主要依赖于生物信息学分析。此外,虽然在临床样本中测量了LAMA3的表达水平,但缺乏其与患者预后的深入关联研究。最后,LAMA3如何具体影响PC的EMT过程仍需进一步探讨。

综上所述,本研究利用生物信息学手段筛选了EMT相关PC基因LAMA3。LAMA3在PC中表达上调,可能通过调控EMT过程进而影响PC细胞的侵袭和迁移能力。因此,LAMA3有望成为一种新的诊断标志物和基因治疗靶点。

**伦理学声明:** 本研究方案于2023年6月14日经由贵州医科大学附属医院伦理委员会审批,批号:2023伦审第494号。

**利益冲突声明:** 本文不存在任何利益冲突。

**作者贡献声明:** 杨能红、李铸、赵宇翔负责课题设计,资料分析,撰写论文;任笠坤、田舍、韩民参与细胞培养、实验操作、收集数据和修改论文;刘鹏负责拟定写作思路,指导撰写文章并最后定稿。

#### 参考文献:

- [1] HALBROOK CJ, LYSSOTIS CA, PASCA DI MAGLIANO M, et al. Pancreatic cancer: Advances and challenges[J]. Cell, 2023, 186(8): 1729-1754. DOI: 10.1016/j.cell.2023.02.014.
- [2] GAIANIGO N, MELISI D, CARBONE C. EMT and treatment resistance in pancreatic cancer[J]. Cancers, 2017, 9(9): 122. DOI: 10.3390/cancers9090122.
- [3] FRIEND C, PARAJULI P, RAZZAQUE MS, et al. Deciphering epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic cancer[J]. Adv Cancer Res, 2023, 159: 37-73. DOI: 10.1016/bs.acr.2023.02.008.
- [4] KECHAGIA Z, SÁEZ P, GÓMEZ-GONZÁLEZ M, et al. The laminin-keratin link shields the nucleus from mechanical deformation and signalling[J]. Nat Mater, 2023, 22(11): 1409-1420. DOI: 10.1038/s41563-023-01657-3.
- [5] TAYEM R, NIEMANN C, PESCH M, et al. Laminin 332 is indispensable for homeostatic epidermal differentiation programs[J]. J Invest Dermatol, 2021, 141(11): 2602-2610. e3. DOI: 10.1016/j.jid.2021.04.008.
- [6] O'CONNELL P. Of LAMA3 and LAMB3: A novel gene therapy for epidermolysis bullosa[J]. Mol Ther, 2024, 32(5): 1197-1198. DOI: 10.1016/j.ymthe.2024.04.014.
- [7] YAMASHITA H, TRIPATHI M, HARRIS MP, et al. The role of a recombinant fragment of laminin-332 in integrin  $\alpha 3\beta 1$ -dependent cell binding, spreading and migration[J]. Biomaterials, 2010, 31(19): 5110-5121. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.03.003.
- [8] ZENZO GD, HACHEM ME, DI OCIAIUTI A, et al. A truncating mutation in the laminin-332 $\alpha$  chain highlights the role of the LG45 proteolytic domain in regulating keratinocyte adhesion and migration[J].

- Br J Dermatol, 2014, 170(5): 1056-1064. DOI: 10.1111/bjd.12816.
- [9] TOMCZAK K, CZERWIŃSKA P, WIZNEROWICZ M. The Cancer Genome Atlas (TCGA): An immeasurable source of knowledge[J]. Contemp Oncol, 2015, 19(1A): A68-A77. DOI: 10.5114/wo.2014.47136.
- [10] SUBRAMANIAN A, TAMAYO P, MOOTHA VK, et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(43): 15545-15550. DOI: 10.1073/pnas.0506580102.
- [11] CARITHERS LJ, MOORE HM. The genotype-tissue expression (GTEx) project[J]. Biopreserv Biobank, 2015, 13(5): 307-308. DOI: 10.1089/bio.2015.29031.hmm.
- [12] BARRETT T, WILHITE SE, LEDOUX P, et al. NCBI GEO: Archive for functional genomics data sets: Update[J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41(Database issue): D991-D995. DOI: 10.1093/nar/gks1193.
- [13] UHLEN M, ZHANG C, LEE S, et al. A pathology atlas of the human cancer transcriptome[J]. Science, 2017, 357(6352): eaan2507. DOI: 10.1126/science.aan2507.
- [14] HUANG CQ, CHEN J. Laminin-332 mediates proliferation, apoptosis, invasion, migration and epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. Mol Med Rep, 2021, 23(1): 11. DOI: 10.3892/mmr.2020.11649.
- [15] TRAUB B, LINK KH, KORNMANN M. Curing pancreatic cancer[J]. Semin Cancer Biol, 2021, 76: 232-246. DOI: 10.1016/j.semcancer.2021.05.030.
- [16] PARK W, CHAWLA A, O'REILLY EM. Pancreatic cancer: A review [J]. JAMA, 2021, 326(9): 851-862. DOI: 10.1001/jama.2021.13027.
- [17] DERYNCK R, WEINBERG RA. EMT and cancer: More than meets the eye[J]. Dev Cell, 2019, 49(3): 313-316. DOI: 10.1016/j.devcel.2019.04.026.
- [18] PALAMARIS K, FELEKOURAS E, SAKELLARIOU S. Epithelial to mesenchymal transition: Key regulator of pancreatic ductal adenocarcinoma progression and chemoresistance[J]. Cancers, 2021, 13(21): 5532. DOI: 10.3390/cancers13215532.
- [19] SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. Cancer statistics, 2016[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(1): 7-30. DOI: 10.3322/caac.21332.
- [20] LI DD, XIA LY, HUANG P, et al. Heterogeneity and plasticity of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in cancer metastasis: Focusing on partial EMT and regulatory mechanisms[J]. Cell Prolif, 2023, 56(6): e13423. DOI: 10.1111/cpr.13423.
- [21] REN H, DU PZ, GE ZY, et al. TWIST1 and BMI1 in cancer metastasis and chemoresistance[J]. J Cancer, 2016, 7(9): 1074-1080. DOI: 10.7150/jca.14031.
- [22] PAUL MC, SCHNEEWEIS C, FALCOMATÀ C, et al. Non-canonical functions of SNAIL drive context-specific cancer progression[J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 1201. DOI: 10.1038/s41467-023-36505-0.
- [23] WEI T, ZHANG XY, ZHANG Q, et al. Vimentin-positive circulating tumor cells as a biomarker for diagnosis and treatment monitoring in patients with pancreatic cancer[J]. Cancer Lett, 2019, 452: 237-243. DOI: 10.1016/j.canlet.2019.03.009.
- [24] MALTSEVA DV, RODIN SA. Laminins in metastatic cancer[J]. Mol Biol, 2018, 52(3): 411-434. DOI: 10.7868/S0026898418030059.
- [25] ROUSSELLE P, SCOAZEC JY. Laminin 332 in cancer: When the extracellular matrix turns signals from cell anchorage to cell movement [J]. Semin Cancer Biol, 2020, 62: 149-165. DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.09.026.
- [26] NING BS, MEI YE. LAMA3 promotes tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma by METTL3-mediated N6-methyladenosine modification[J]. Crit Rev Immunol, 2024, 44(2): 49-59. DOI: 10.1615/CritRevImmunol.2023051066.
- [27] ISLAM K, BALASUBRAMANIAN B, VENKATRAMAN S, et al. Upregulated LAMA3 modulates proliferation, adhesion, migration and epithelial-to-mesenchymal transition of cholangiocarcinoma cells[J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 22598. DOI: 10.1038/s41598-023-48798-8.
- [28] FENG LY, HUANG YZ, ZHANG W, et al. LAMA3 DNA methylation and transcriptome changes associated with chemotherapy resistance in ovarian cancer[J]. J Ovarian Res, 2021, 14(1): 67. DOI: 10.1186/s13048-021-00807-y.

收稿日期: 2024-06-05; 录用日期: 2024-07-11

本文编辑: 王亚南

引证本文: YANG NH, REN LK, TIAN S, et al. Effect of laminin subunit  $\alpha 3$  on epithelial-mesenchymal transition, invasion, and metastasis abilities of pancreatic cancer[J]. J Clin Hepatol, 2025, 41(2): 322-332.  
杨能红, 任笠坤, 田舍, 等. 层粘连蛋白  $\alpha 3$  亚基 (LAMA3) 对胰腺癌上皮间质转化、侵袭和转移能力的影响[J]. 临床肝胆病杂志, 2025, 41(2): 322-332.

· 消息 ·

## 《临床肝胆病杂志》入选“中国开放阅读科技期刊目录(DCORJ)”

2025年1月21日,本刊收到中国高校科技期刊研究会通知:《临床肝胆病杂志》入选“中国开放阅读科技期刊目录(Directory of China Open Reading STM Journals, DCORJ)”。该目录的核心功能是对中国科技期刊自建平台的阅读性、可发现性、标识完整性和用户体验性进行客观评估,通过阅读指数、发现指数、体验指数和标识指数4个一级指标,全面量化展示期刊的数字化进展和开放阅读程度,为期刊网站的数字化表现、交互设计、信息检索等方面提供优化指引。

期刊开放阅读指数由上述指标综合计算得出,根据开放阅读指数得分确定期刊开放阅读星级:开放阅读指数>75为★★★★★,>65为★★★★,>55为★★★,>30为★★,>15为★。2025年1月数据显示,该目录已收录1236种科技期刊,《临床肝胆病杂志》开放阅读星级:★★★★★,开放阅读指数排名:11/1236。

《临床肝胆病杂志》编辑部

2025年2月25日