

网络出版时间:2024-11-18 16:08:57 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20241115.1541.005

胰腺星状细胞通过旁分泌效应 促进胰腺癌细胞的 PIK3C2A 表达及生长

岳展¹, 甄可妙², 崔皓哲², 应万涛^{1,2}

[¹ 安徽医科大学基础医学院, 合肥 230032; ² 医学蛋白质全国重点实验室, 北京蛋白质组研究中心, 国家蛋白质科学中心(北京), 军事科学院军事医学研究院生命组学研究所, 北京 102206]

摘要 目的 研究胰腺星状细胞(PSC)的分泌蛋白对胰腺导管腺癌细胞(PANC-1)的作用及调控机制。方法 通过间接共培养的方式,收集PSC的条件培养基(CM),分别培养PANC-1细胞0、2、24 h。CCK-8检测不同刺激时段PANC-1细胞的增殖表型。运用蛋白质组学手段,分析PANC-1细胞在蛋白水平上发生的变化,并用Western blot验证变化最显著的蛋白。结果 与对照组相比,经PSC来源的CM刺激后,PANC-1细胞增殖速度加快;蛋白质组学数据分析结果表明,PANC-1细胞在PSC的CM分别培养0、2、24 h后,代谢相关通路的蛋白表达不断升高;基于Western blot验证了PIK3C2A在PANC-1细胞中的升高趋势,表明PSC的CM可能通过上调PIK3C2A的表达从而促进PANC-1细胞的增殖。结论 PSC的CM可能通过旁分泌效应上调PIK3C2A的表达从而促进PANC-1细胞的增殖,提升了肿瘤微环境中PSC与胰腺癌细胞之间的交互对话机制的认识。

关键词 胰腺星状细胞;条件培养基;间接共培养;蛋白质组学

中图分类号 Q 735.9

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)11-1919-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.11.005

2024-02-12 接收

基金项目:国家重点研发计划项目(编号:2021YFA1301602)

作者简介:岳展,女,硕士研究生;

应万涛,男,研究员,博士生导师,通信作者,E-mail:ying-wantao@ncpsb.org.cn

胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)恶性程度高,预后差,起病隐匿,其侵袭性和对化疗的耐药反应与结缔组织高度增生的微环境密切相关^[1],胰腺星状细胞(pancreatic stellate cell, PSC)是PDAC微环境中数量最多的细胞类型。

nitrogen (BUN) levels. HE staining and PAS staining were used to observe renal pathology, and transmission electron microscopy was used to observe renal ultrastructure. Western blot and immunohistochemistry were used to detect the changes in the expression levels of KIM-1, NGAL and pyroptosis-related proteins. In the cell experiment, the cells were treated with cisplatin (20 $\mu\text{mol/L}$) and LPZ (5 $\mu\text{mol/L}$) for 24 hours, and the expressions of KIM-1, NGAL and pyroptosis-related factors were detected by Western blot and Real-time PCR. **Results** Compared with the NC group, CRE and BUN levels increased in the CIS group, and LPZ treatment aggravated the serological indicators of the mice ($P < 0.001$). Histopathological examination showed that compared with the CIS group, the LPZ + CIS group had obvious renal tubular dilatation, inflammatory cell infiltration and glycogen deposition in the renal tissue ($P < 0.001$). Electron microscopy showed swelling of mitochondria, increased membrane density and decreased or absent mitochondrial crista in CIS group, which were aggravated by LPZ + CIS group. *In vivo* and *in vitro* experiments confirmed that LPZ treatment promoted CIS-induced acute kidney injury in mice and increased the expression levels of kidney injury factors KIM-1, NGAL and key factors of renal pyroptosis (Caspase 1, GSDMD, NLRP3 and IL-18) in renal tubular epithelial cells ($P < 0.001$). **Conclusion** Lansoprazole promotes cisplatin-induced acute kidney injury by enhancing pyroptosis of renal tubular epithelial cells

Key words acute kidney injury; lansoprazole; pyroptosis; cisplatin; inflammation

Fund program National Natural Science Foundation of China (No. 81770722); 2023 Basic and Clinical Promotion Plan of Anhui Medical University (No. 2023xkjT034)

Corresponding author Wu Yonggui, E-mail: wuyonggui@medmail.com.cn

研究^[2]发现,PSC 可促进肿瘤上皮细胞的增殖,并能增强 PDAC 纤维化、转移和化疗耐药。目前研究细胞间相互作用的方法之一为间接共培养,其特点是先收集一种细胞的条件培养基,其中包含该类细胞释放的细胞因子、信号分子和外泌体等,再将该条件培养基用于刺激其他类型的细胞生长,并观察受刺激细胞的表型和分子特征变化,从而揭示两类细胞之间的信号交流^[3]。

该文拟基于蛋白质组学方法,探索 PSC 的分泌蛋白刺激后对 PDAC 细胞蛋白质组的影响。采用间接共培养的方式,收集 PSC 无血清培养 24 h 后的培养基为条件培养基(conditioned medium, CM),刺激 PANC-1 细胞,进一步开展表型验证和差异蛋白质组学分析,从而揭示微环境中 PSC 释放因子调控 PDAC 肿瘤细胞生长的潜在机制(整体研究路线见图 1)。

1 材料与方法

1.1 材料 人 HPSC 和 PANC-1 细胞购自国家生物医学实验细胞资源库(NSTI-BMCR);胎牛血清购自美国 Gibco 公司;Millipore Amicon[®] Ultra 0.5 ml 超滤管;细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 试剂购自北京金普来公司;二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA) 蛋白定量试剂盒购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;胰蛋白酶 Trypsin 购自 Promega(北京)公司;细胞计数仪与细胞计数板均购自美国 Bio-Rad 公司;兔源 PIK3C2A、鼠源

GAPDH、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔、羊抗鼠均购自武汉三鹰生物技术有限公司(Proteintech Group)。

1.2 细胞培养 PSC 与 PANC-1 细胞均培养在含 10% 胎牛血清、1% 双抗的 DMEM 培养基中,并将其置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中,当细胞密度为 80% ~ 90% 时进行传代,至少稳定传两代后用于后续实验。

1.3 无血清培养条件下 PSC 细胞增殖实验 取对数生长期的 PSC 细胞,按照 5 000 个/孔的密度铺于 96 孔板内,细胞贴壁后替换为无血清培养基(对照组为含 10% 胎牛血清的培养基),在无血清培养 0、24、48、72、96 h 时,每孔加入 10 μl 的 CCK-8 溶液,置于 37 °C 恒温培养箱中孵育 1 h 后,于酶标仪检测 450 nm 处的吸光度(optical density, OD)值。

1.4 CM 的收集 PSC 生长密度为 60% ~ 70% 时,将培养基替换为无血清 CM,并收集培养 24 h 后的 CM,3 000 r/min 离心 15 min 后取上清液,用 0.2 μm 的滤膜过滤后得到 CM。

1.5 CCK-8 检测 CM 刺激后 PANC-1 细胞的增殖曲线 PANC-1 细胞的铺板方法与 PSC 相同。细胞贴壁后,将培养基替换为 PSC 来源的 CM,待培养至 0、2、24、48、72 h 时,加入 10 μl 的 CCK-8 检测试剂,于 37 °C 恒温培养箱孵育 1 h 后,酶标仪检测 450 nm 处的 OD 值。对照组为无血清培养基以及含 10% 胎牛血清的培养基。

1.6 PANC-1 细胞蛋白质组学样本制备 将 PANC-1

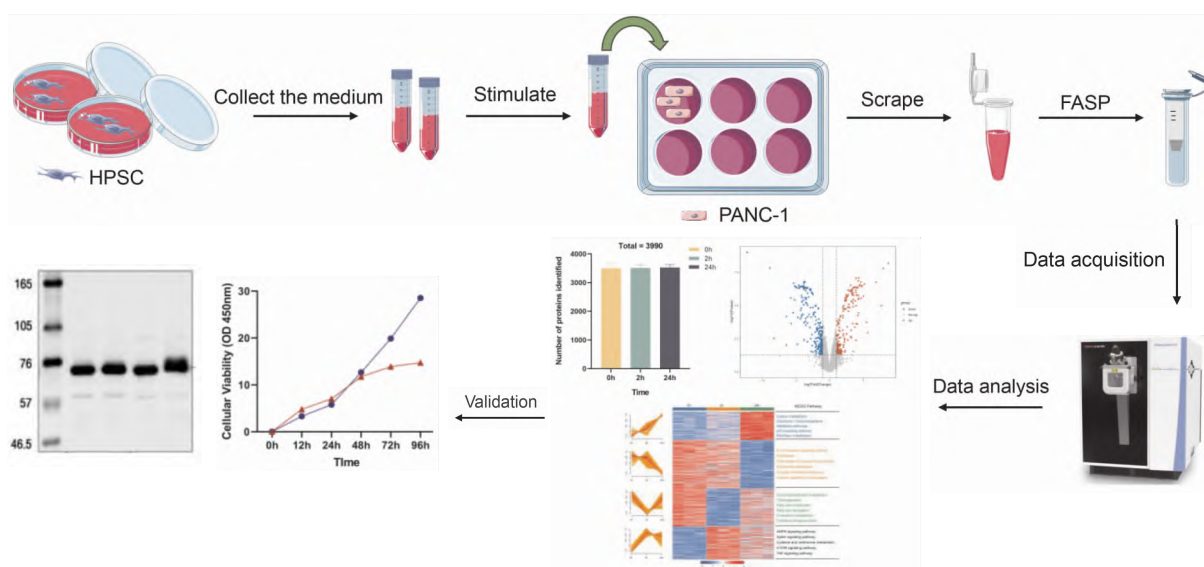


图 1 细胞间交互调控蛋白质组分析的研究策略

Fig. 1 Research strategies for proteomic analysis of intercellular interaction regulation

细胞按照 6×10^5 个/孔的密度铺于 6 孔板中,贴壁后替换为 PSC 的条件培养基,分别培养 PANC-1 细胞 0、2、24 h 后,加入裂解液(尿素 8 mol/L、蛋白酶抑制剂),在超声波细胞粉碎机 50 W 功率下超声 5 min,取上清液,用 BCA 定量试剂盒进行蛋白定量。准确取 100 μ g 蛋白进行 FASP 酶切,酶切后的肽段于 45 $^{\circ}$ C 热干,0.1% 的甲酸溶液复溶肽段,NanoDrop One 微量紫外可见分光光度计定量,每个样本取 500 ng 进行 Orbitrap Exploris 480 质谱分析,数据依赖性采集(data dependent acquisition, DDA)模式。

1.7 Western blot 检测 PANC-1 细胞中 PIK3C2A 蛋白的表达 取 15 μ g 的 PANC-1 细胞蛋白进行 Western blot 分析,经电泳分离、转膜、室温快速封闭 15 min 后,将硝酸纤维素膜(nitrocellulose membrane, NC)与一抗 PIK3C2A(1:5 000)、GAPDH(1:100 000)置于 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育,含吐温 20 的 Tris 盐缓冲液(tris-buffered saline with Tween20, TBST)缓冲液洗膜 3 次,每次 5 min。再加入辣根过氧化物酶(horse-radish peroxidase, HRP)标记的二抗(1:5 000)在 4 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。加入化学发光超敏(enhanced chemiluminescence, ECL)试剂进行显影,通过 Image J 软件评估蛋白灰度值,将灰度值分别进行方差分析(ANOVA)及 *t* 检验分析。

1.8 统计学处理 将所得的质谱采集文件在 Max-Quant 2.1.4 版本中进行搜库匹配。使用 R 包 preprocessCore(version 1.62.1)对数据矩阵进行归一化,以邻近法进行填充,用 limma 包(version

3.54.2)进行组间的差异分析,筛选 $P < 0.05$ 且 $|\log_2(\text{FoldChange})| > 1$ 为特征蛋白。3 组间的比较使用卡方检验进行分析。借用公开发表数据^[4],对 PIK3C2A 分子进行预后分析,绘制 Kaplan-Meier 生存曲线。使用通路分析软件(Ingenuity Pathway Analysis, IPA)对组间差异蛋白进行通路分析和相互作用网络分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,分析与图表均在 R 4.1.3 版本与 GraphPad Prism 8.0 版本中进行。

2 结果

2.1 PSC 的 CM 促进 PANC-1 细胞增殖 与对照组(含 10% 胎牛血清培养)相比,无血清培养 PSC 至 24 h 后细胞快速增殖,但在 24 h 后增殖速度减慢,48 h 后增殖能力明显低于对照组。由于在培养至 24 h 时,无血清培养组与对照组的增殖能力相近,因此选择第 24 h 的时间点收集 PSC 的培养基(图 2A),按照 1.4 的方法处理后形成 CM。用收集的 PSC 的 CM 刺激 PANC-1 细胞,CCK-8 检测结果表明,与无血清以及含 10% 胎牛血清培养条件下相比,PANC-1 细胞在 PSC 的 CM 刺激后快速增殖,在培养 24 h 后细胞增殖速度变缓,48 h 时增殖活力明显低于含 10% 胎牛血清培养的 PANC-1 细胞(图 2B)。

2.2 PSC 的 CM 刺激后 PANC-1 细胞的代谢相关功能增强 为探究 CM 培养后 PANC-1 细胞蛋白水平的变化,将 PANC-1 细胞置于 PSC 的 CM 中分

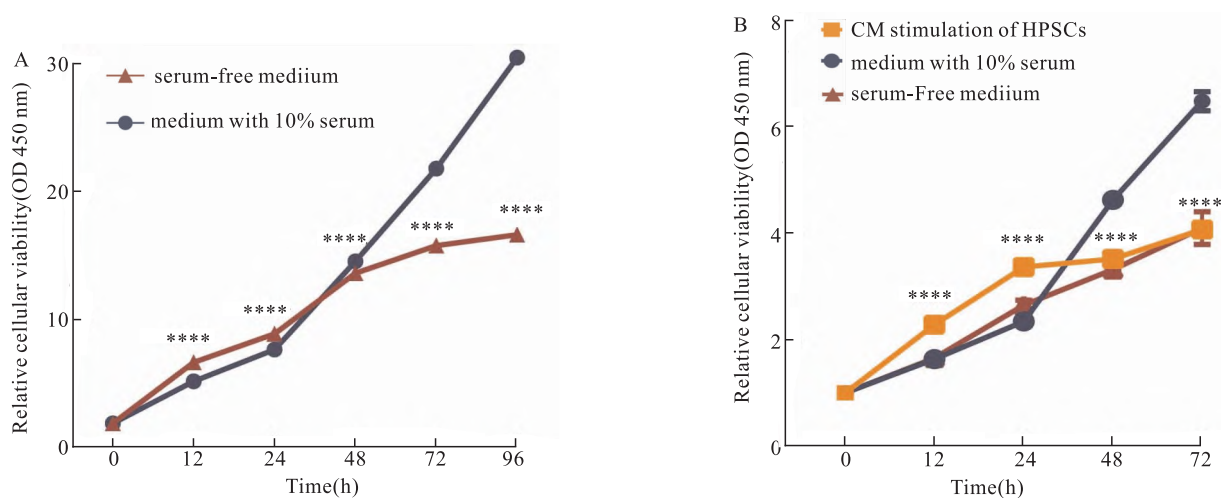


图 2 CCK-8 检测细胞的增殖水平

Fig. 2 CCK-8 assay for detecting cell proliferation levels

A: The proliferative capacity of PSCs under different culture conditions; B: The proliferation curve of PANC-1 under different culture conditions; 10% fetal bovine serum culture serves as the control group; **** $P < 0.0001$ vs the control group.

别培养 0、2、24 h,并对不同培养时间的 PANC-1 细胞进行蛋白质组表达分析,共鉴定到 3 990 个蛋白(图 3A)。

与未经 PSC 的 CM 培养的 PANC-1 细胞(即 0 h)相比,共筛选出 720 个特征蛋白($P < 0.05$ 且 $|\log_2FC| > 1$,图 3B),将特征蛋白进行 Mfuzz 时序分析,可分为 4 个模块,将各模块蛋白进行 KEGG 通路富集分析,代谢、糖酵解相关通路在 0 h 到 24 h 持续上升,即在 PSC 的 CM 刺激后,PANC-1 细胞的代谢通路被持续激活;B 细胞受体信号通路与泛素介导的蛋白水解相关等通路持续下调;脂肪酸代谢相关通路在培养至 2 h 时显著下调(图 3C)。

2.3 PIK3C2A 在 PSC 的 CM 刺激后的 PANC-1 细胞中的表达水平持续升高

2.3.1 PSC 的 CM 持续上调 PANC-1 细胞中 PIK3C2A 的表达 在 PSC 的 CM 培养 PANC-1 细胞 0-2-24 h 过程中,有 16 个蛋白的表达持续升高(表 1)。以 24 h-0 h 的变化倍数排序,代谢通路中差异倍数变化较大且预后显著的蛋白为 PIK3C2A 与 ANKRD28,其中 PIK3C2A 在 3 组样本间的表达差异有统计学意义($P < 0.05$,图 4A、B)。IPA 分析显示,PIK3C2A 为磷脂酰肌醇代谢通路的关键蛋白(图 4C),目前关于 PIK3C2A 在胰腺癌中发挥的作

用的研究较少。

2.3.2 PIK3C2A 的 Western blot 检测结果 Western blot 验证结果表明,与对照组相比,PSC 的 CM 刺激后的 PANC-1 细胞中的 PIK3C2A 的表达水平持续上升,即 PSC 可能通过上调 PIK3C2A 的表达促进 PANC-1 细胞的增殖,3 组间方差分析 $P = 0.015$ (图 5)。

3 讨论

PDAC 是恶性程度最高的消化系统肿瘤,起病隐匿,发病率在全世界范围内不断升高,患者五年总生存率为 5%~15%,数十年来无明显改善^[5]。近年来,随着对 PDAC 的深入研究,肿瘤微环境成为发现 PDAC 新治疗靶点的热点。PSC 是 PDAC 微环境中所占比例最高的细胞^[6],在肿瘤的发生发展进程中扮演着不可或缺的角色,可通过免疫抑制、血管生成、细胞外基质重塑、促肿瘤生长因子和趋化因子^[7]分泌等多种机制促进癌症的生长^[8]、转移^[9]和对化疗耐药性^[10]。

目前已有相关研究^[11]表明 PSC 释放到培养基中的脱氧胞苷可促进 PDAC 细胞对吉西他滨耐药,PSC 分泌的转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor beta 1, TGF- $\beta 1$)通过下调 L1 细胞黏附分子

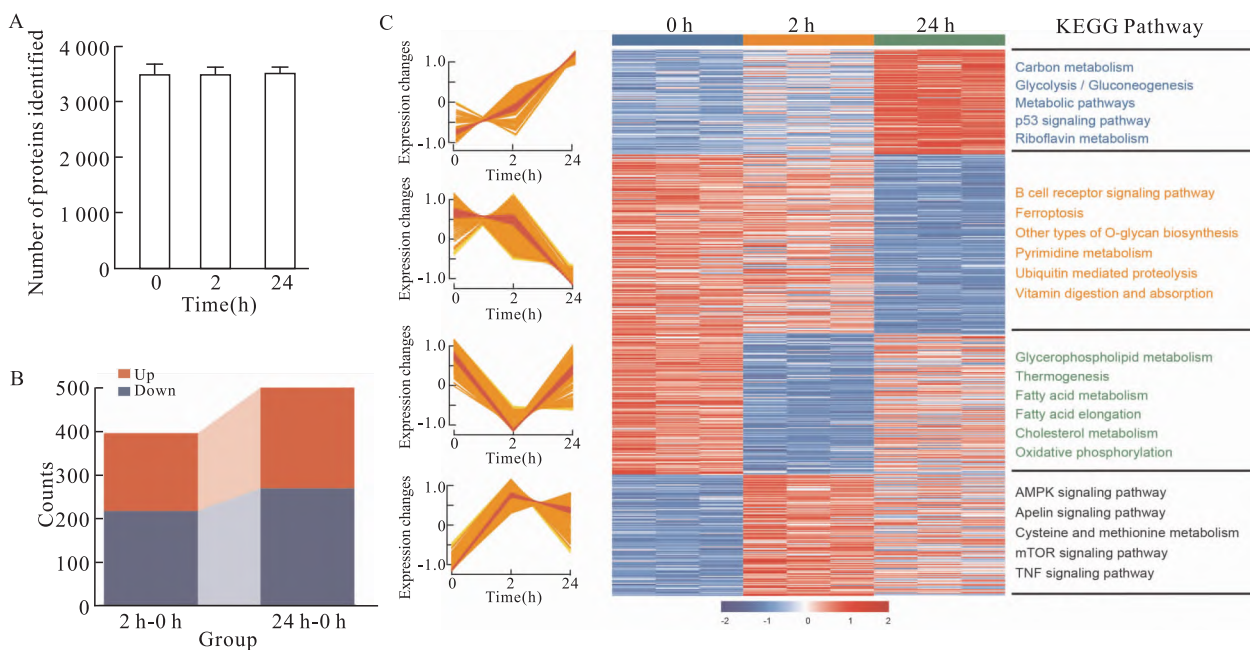


图 3 胰腺星状细胞条件培养基处理不同时间的 PANC-1 细胞蛋白质组分析

Fig. 3 Proteomic analysis of PANC-1 cells treated with pancreatic stellate cell-conditioned medium for different durations

A: Histogram of the number of proteins identified over the three time periods; B: The number of differentially expressed proteins (considered as "Up" if $P < 0.05$ and $\log_2FC > 1$, and "Down" if $P < 0.05$ and $\log_2FC < -1$) between 2 hours, 24 hours, and 0 hours; C: After Mfuzz analysis of the feature proteins from 2 h/0 h and 24 h/0 h, the selected feature proteins are subjected to KEGG pathway enrichment analysis and clustering heatmap.

表 1 PSC 的 CM 培养 PANC-1 细胞 0-2-24 h 过程中表达持续上调的蛋白列表
 Tab. 1 The list of proteins that are continuously upregulated during the 0-2-24 hour culture of PANC-1 cells with conditioned medium from PSCs

Accession Number	Gene	log ₂ FC 2 h/0 h	P	log ₂ FC 24 h/0 h	P	log ₂ FC 24 h/2 h	P
Q9BX26	SYCP2	4.80E+00	3.31E-07	5.87E+00	6.11E-08	1.08E+00	2.11E-03
Q53H96	PYCR3	3.72E+00	4.27E-07	5.39E+00	1.55E-04	1.67E+00	3.56E-02
O00443	PIK3C2A	3.49E+00	1.26E-05	5.16E+00	6.95E-08	1.67E+00	7.51E-04
Q8NHP8	PLBD2	3.52E+00	1.74E-06	4.77E+00	7.72E-07	1.26E+00	2.24E-03
Q13426	XRCC4	3.48E+00	6.80E-06	4.69E+00	9.74E-08	1.21E+00	2.10E-03
O15084	ANKRD28	3.43E+00	2.30E-04	4.61E+00	6.74E-08	1.18E+00	2.93E-02
Q9Y3R5	DOP1B	2.58E+00	2.09E-06	4.55E+00	1.01E-03	1.98E+00	3.81E-02
P09417	QDPR	2.58E+00	2.09E-06	3.86E+00	1.28E-07	1.28E+00	1.07E-04
Q7L5Y1	ENOSF1	2.52E+00	2.22E-06	3.85E+00	1.65E-05	1.33E+00	4.38E-03
Q9ULK4	MED23	2.40E+00	3.55E-06	3.83E+00	4.34E-06	1.43E+00	1.06E-03
Q9BVQ7	AFG2B	2.02E+00	1.95E-03	3.63E+00	2.98E-07	1.60E+00	5.67E-03
O60573	EIF4E2	2.09E+00	1.07E-05	3.50E+00	1.55E-05	1.40E+00	2.41E-03
Q6P1M3	LLGL2	1.94E+00	1.39E-05	3.14E+00	9.09E-06	1.19E+00	2.06E-03
Q02224	CENPE	1.18E+00	5.93E-03	2.80E+00	2.80E-06	1.62E+00	1.44E-03
P42785	PRCP	1.19E+00	1.58E-02	2.63E+00	2.37E-03	1.44E+00	3.90E-02
O75832	PSMD10	1.25E+00	1.52E-02	2.32E+00	2.98E-04	1.07E+00	6.86E-03

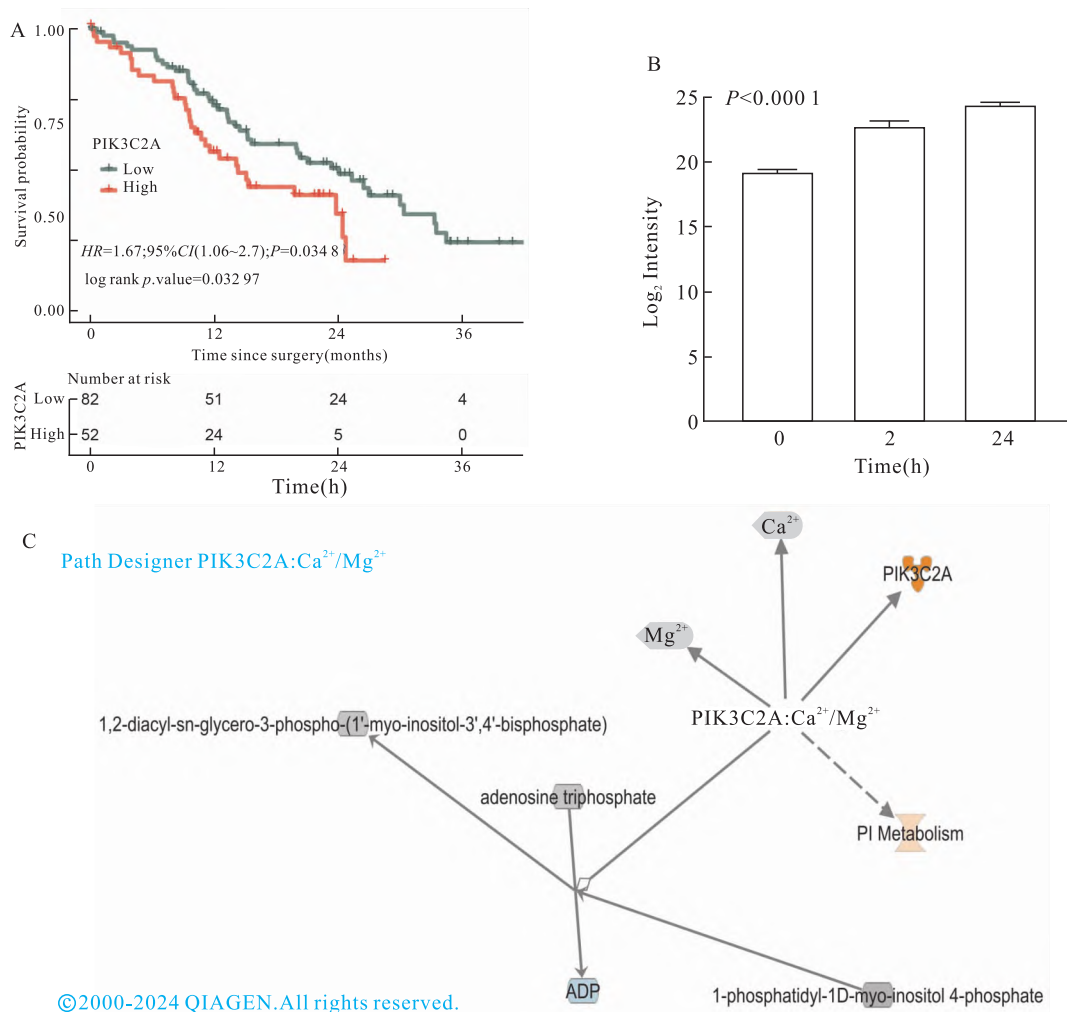


图 4 PIK3C2A 在样本中的表达
 Fig. 4 Expression of PIK3C2A in the sample

A: The KM survival curve of PIK3C2A in PDAC patients; B: The expression level bar chart of PIK3C2A in the three groups; C: The results of the IPA for PIK3C2A.

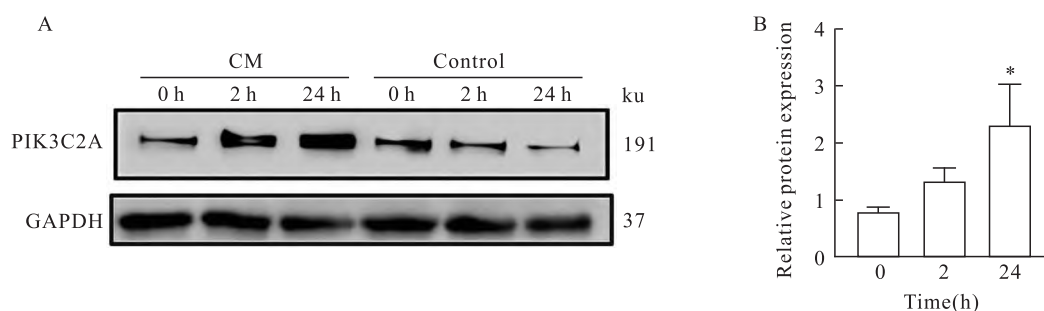


图5 PIK3C2A 在 PANC-1 细胞中的表达水平

Fig. 5 The expression level of PIK3C2A in PANC-1 cells

A: The Western blot of PIK3C2A and GAPDH in PANC-1 cells after CM stimulation; B: The relative expression level of PIK3C2A; * $P < 0.05$ vs the 0 h group.

(L1 cell adhesion molecule, L1CAM) 的表达从而促进 PDAC 细胞的干性和致癌性^[12], 以及 PSC 分泌的整合素亚基 $\alpha 5$ (integrin subunit alpha 5, ITGA5) 可增强 PDAC 细胞系的耐药性、迁移和侵袭能力^[13]。

本文的蛋白质组研究结果表明, PANC-1 细胞在 PSC 的 CM 刺激后增殖速度加快, 代谢相关功能不断增强, PIK3C2A 蛋白的表达水平持续升高, 且 PIK3C2A 蛋白表达高的人群预后较差。PIK3C2A 是磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3Ks) 家族的 II 类亚型分子, 定位于内体、反式高尔基体网络和网格蛋白包被的囊泡中, 参与磷脂酰肌醇信号转导系统, 对磷脂酰肌醇的磷酸化、控制膜脂质组成和其他细胞内过程 (包括信号转导和囊泡运输) 至关重要。研究^[14] 显示 PIK3C2A 是内皮细胞中 TGF- β 通路中 Smad 信号传导的必需分子, 但其在胰腺癌中的研究较少, 本研究为 PI3Ks 家族的 II 类亚型分子在 PDAC 中发挥的作用提供了新的思考, 但 PSC 细胞如何通过旁分泌效应上调 PIK3C2A 的表达进而促进肿瘤发生发展的机制有待继续研究。

综上所述, 本研究通过间接共培养的方式, 收集无血清培养 PSC 后的 CM 刺激 PANC-1 细胞, 结果表明, 与对照组相比, CM 刺激后的 PANC-1 细胞快速增殖。通过蛋白质组学技术分析 CM 刺激后的 PANC-1 细胞的蛋白水平的变化及进一步 Western blot 验证, 显示磷脂酰肌醇代谢系列通路异常。在 CM 刺激后的 PANC-1 细胞中 PIK3C2A 的表达随着培养时间的增加而不断增加, 说明 PSC 可能通过上调 PIK3C2A 的表达来促进胰腺癌细胞的增殖。

参考文献

[1] Mazur P K, Siveke J T. Genetically engineered mouse models of

pancreatic cancer: unravelling tumour biology and progressing translational oncology [J]. *Gut*, 2012, 61 (10): 1488 - 500. doi:10.1136/gutjnl-2011-300756.

[2] Zhao T, Xiao D, Jin F, et al. ESE3-positive PSCs drive pancreatic cancer fibrosis, chemoresistance and poor prognosis *via* tumour-stromal IL-1 β /NF- κ B/ESE3 signalling axis [J]. *Br J Cancer*, 2022, 127(8): 1461 - 72. doi:10.1038/s41416-022-01927-y.

[3] Xu J, Liu S, Yang X, et al. Paracrine HGF promotes EMT and mediates the effects of PSC on chemoresistance by activating c-Met/PI3K/Akt signaling in pancreatic cancer *in vitro* [J]. *Life Sci*, 2020, 263: 118523. doi:10.1016/j.lfs.2020.118523.

[4] Cao L, Huang C, Cui Zhou D, et al. Proteogenomic characterization of pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Cell*, 2021, 184 (19): 5031 - 52. e26. doi:10.1016/j.cell.2021.08.023.

[5] Yang Y, Zhang Z, Tian X. Current research status and progress in molecular subtyping of pancreatic cancer [J]. *Chin J Digest Surg*, 2019, (7): 616 - 20. doi: 10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2019.07.002.

[6] Murray E R, Menezes S, Henry J C, et al. Disruption of pancreatic stellate cell myofibroblast phenotype promotes pancreatic tumor invasion [J]. *Cell Rep*, 2022, 38(4): 110227. doi:10.1016/j.celrep.2021.110227.

[7] Shi Y, Gao W, Lytle N K, et al. Targeting LIF-mediated paracrine interaction for pancreatic cancer therapy and monitoring [J]. *Nature*, 2019, 569(7754): 131 - 5. doi:10.1038/s41586-019-1130-6.

[8] Marzouq A J, Mustafa S A, Heidrich L, et al. Impact of the secretome of activated pancreatic stellate cells on growth and differentiation of pancreatic tumour cells [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 5303. doi:10.1038/s41598-019-41740-x.

[9] Apte M V, Wilson J S, Lugea A, et al. A starring role for stellate cells in the pancreatic cancer microenvironment [J]. *Gastroenterology*, 2013, 144(6): 1210 - 9. doi:10.1053/j.gastro.2012.11.037.

- [10] Wang Z, He R, Dong S, et al. Pancreatic stellate cells in pancreatic cancer: as potential targets for future therapy[J]. *Front Oncol*, 2023, 13: 1185093. doi:10.3389/fonc.2023.1185093.
- [11] Dalin S, Sullivan M R, Lau A N, et al. Deoxycytidine release from pancreatic stellate cells promotes gemcitabine resistance[J]. *Cancer Res*, 2019, 79(22): 5723–33. doi:10.1158/0008-5472.CAN-19-0960.
- [12] Cave D D, Di Guida M, Costa V, et al. TGF- β 1 secreted by pancreatic stellate cells promotes stemness and tumorigenicity in pancreatic cancer cells through LICAM downregulation[J]. *Oncogene*, 2020, 39(21): 4271–85. doi:10.1038/s41388-020-1289-1.
- [13] Wang T, Yang J, Mao J, et al. ITGA5 inhibition in pancreatic stellate cells re-educates the *in vitro* tumor-stromal crosstalk[J]. *Med Oncol*, 2022, 40(1): 39. doi:10.1007/s12032-022-01902-w.
- [14] Aki S, Yoshioka K, Okamoto Y, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase class II α -isoform PI3K-C2 α is required for transforming growth factor β -induced Smad signaling in endothelial cells[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(10): 6086–105. doi:10.1074/jbc.M114.601484.

Pancreatic stellate cells promote the PIK3C2A expression and growth of pancreatic cancer cells through paracrine effects

Yue Zhan¹, Zhen Kemiao², Cui Haozhe², Ying Wantao^{1,2}

¹*School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032;*

²*State Key Laboratory of Medical Proteomics, Beijing Proteome Research Center, National Center for Protein Sciences (Beijing), Beijing Institute of Lifeomics, Beijing 102206]*

Abstract Objective To study the effect and regulatory mechanism of secreted proteins from PSC on pancreatic ductal adenocarcinoma cells (PANC-1). **Methods** Conditioned medium (CM) from pancreatic stellate cells (PSC) was collected through an indirect co-culture method, and PANC-1 cells were cultured separately with CM for 0, 2, and 24 h. The proliferation phenotype of PANC-1 cells under different stimulation periods was detected using the CCK-8 assay. Proteomic analysis was performed to analyze the changes in protein levels of PANC-1 cells, and the most significant protein changes were validated using Western blot. **Results** Compared with the control group, the proliferation rate of PANC-1 cells increased after being stimulated by PSC derived CM; The results of proteomic analysis showed that the protein expression of metabolic pathways in PANC-1 cells increased continuously after being cultured in PSC CM for 0, 2, and 24 h. Western blot analysis confirmed an increasing trend of PIK3C2A in PANC-1 cells, indicating that the CM from PSC might promote the proliferation of PANC-1 cells by upregulating the expression of PIK3C2A. **Conclusion** The CM of PSC may promote the proliferation of PANC-1 cells by upregulating the expression of PIK3C2A, which improves the understanding of the mechanism of interaction between PSCs and pancreatic cancer cells in the tumor microenvironment.

Key words pancreatic stellate cell; conditioned medium; indirect co-culture; proteomics

Fund program National Key Research and Development Program of China (No. 2021YFA1301602)

Corresponding author Ying Wantao, E-mail: yingwantao@ncpsb.org.cn