

# microRNA-29c 过表达对人胰腺癌 AsPC-1、PANC-1 细胞增殖的影响\*

周显飞, 田 舍, 王 杰, 贾亮亮, 喻 超, 江建新\*\*

(贵州医科大学附院 肝胆外科, 贵州 贵阳 550004)

**[摘要]** 目的: 探讨 microRNA-29c 过表达对人胰腺癌 AsPC-1、PANC-1 细胞增殖的影响。方法: 构建含 microRNA-29c 过表达腺病毒并感染至胰腺癌 AsPC-1 及 PANC-1 细胞(实验组), 感染空载体作为阴性对照组, 采用实时定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 AsPC-1 和 PANC-1 感染 microRNA-29c 24 h 时的感染效率, CCK-8 实验检测 microRNA-29c 感染 48 h 时人胰腺癌细胞的增殖能力, 细胞平板克隆实验检测感染 microRNA-29c 24 h 人胰腺癌细胞的单克隆形成能力。结果: 与阴性对照组比较, microRNA-29c 感染 AsPC-1 及 PANC-1 细胞后 microRNA-29c 表达水平明显升高; 过表达 microRNA-29c 后 AsPC-1 和 PANC-1 细胞增殖能力明显受到抑制, 细胞的克隆形成数明显减少( $P < 0.01$ )。结论: microRNA-29c 过表达能有效抑制胰腺癌细胞的增殖能力, 有望成为治疗胰腺癌的新靶标。

**[关键词]** 微小 RNA; microRNA-29c; 胰腺癌; 细胞增殖; 腺病毒

**[中图分类号]** R735.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2016)09-1002-04

**DOI:** 10.19367/j.cnki.1000-2707.2016.09.003

## Effect of microRNA-29c Over-expression on Proliferation of Human Pancreatic Cancer Cells

ZHOU Xianfei, TIAN She, WANG Jie, JIA Liangliang, YU Chao, JIANG Jianxin

(Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of miR-29c over-expression on the proliferation of human pancreatic cancer cells, AsPC-1、PANC-1. **Methods:** The recombination adenovirus Ad-miR-29c and control adenovirus was constructed and transfected human pancreatic cancer cells, AsPC-1 and PANC-1 cell (experiment group). The expressions of miR-29c in AsPC-1 and PANC-1 cells were detected by real-time PCR. The CCK-8 assay was applied to examine the proliferation ability of miR-29c on the proliferation of human pancreatic cancer cell. The cell colony formation assay was used to measure the growth of the cells after infected by miR-29c for 24 h. **Results:** After infected with Ad-miR-29c and PANC-1, the miR-29c expression levels increased; the over-expression of microRNA-29c in the pancreatic cancer cells significantly inhibited the proliferation abilities of AsPC-1 and PANC-1 cells, cell clone formation abilities were also significantly decreased ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** miR-29c can effectively suppress the proliferation of human pancreatic cancer cells, which makes a promising new therapeutic target for pancreatic cancer.

**[Key words]** micro RNA; miR-29c; pancreatic cancer; cell proliferation; adenovirus

\* [基金项目] 国家国际科技合作专项资助(2014DFA31420); 国家自然科学基金资助项目(81160311)

\*\* 通信作者 E-mail: jix731003@163.com

网络出版时间: 2016-09-13 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20160913.2240.016.html>

胰腺癌是恶性程度最高、预后最差的实体瘤之一,具有极为恶性的生物学特征,其发生发展过程受到多种编码基因与非编码基因的调控<sup>[1]</sup>。尽管目前胰腺癌的诊断和治疗技术有了很大的进展,但其5年生存率仍然很低<sup>[1]</sup>。microRNA 是一类非编码小分子 RNA,成熟的 microRNA 是由发夹状双链 RNA 经 RNase III Dicer 剪切而来,至少 30% 的人类基因受到 microRNA 的调控<sup>[2-3]</sup>。microRNA 可与靶 mRNA 互补结合,从而抑制靶 mRNA 翻译和促进 mRNA 降解<sup>[4-5]</sup>; microRNA 还参与细胞的增殖与死亡、分化、发育、细胞增殖及凋亡等一系列生物学过程,甚至与肿瘤的发生、发展密切相关<sup>[6-8]</sup>。microRNA-29 家族包括 microRNA-29a/b/c, microRNA-29c 位于第 1 号染色体,是该家族主要成员。有研究发现,在胰腺癌组织和细胞中 microRNA-29c 表达降低,并参与胰腺癌的发生发展过程<sup>[9]</sup>,但关于 microRNA-29c 在胰腺癌中的具体生物学功能及作用机制未见报道。因此,进一步了解及完善胰腺癌的发病机制对于胰腺癌的早期发现、诊断及治疗尤为重要。本研究通过 microRNA-29c 过表达腺病毒分别感染胰腺癌 AsPC-1 及 PANC-1 细胞,观察 microRNA-29c 对人胰腺癌细胞增殖的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株及主要试剂

人胰腺癌细胞 AsPC-1 及 PANC-1 获赠于华中科技大学附属同济医院胆胰外科实验室,进口胎牛血清、RPMI、DMEM 及 RPMI 1640 细胞培养基、0.05% 含 EDTA 的胰蛋白酶均购自 gibico 公司, CCK-8 检测试剂盒购自碧云天公司, RNA 抽提试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司, microRNA-29c 腺病毒过表达载体的构建、腺病毒包装与滴度检测由山东维真生物科技有限公司完成,逆转录试剂盒、SYBR Premix ExTaq 试剂盒均购自 TaKaRa 公司, pre-microRNA-29c 的逆转录及 real-time PCR 引物套装购自广州锐博公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** AsPC-1 用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基, PANC-1 用含 10% 胎牛血清的 RPMI DMEM 培养基,两组细胞均置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中培养。

**1.2.2 microRNA-29c 腺病毒感染胰腺癌细胞及感染效率检测** 将 AsPC-1 及 PANC-1 细胞分别分

为 microRNA-29c 感染组(实验组)和空载体组(阴性对照组)。根据腺病毒操作手册查得胰腺癌细胞 AsPC-1 及 PANC-1 的 MOI 值,取  $2 \times 10^5$  个对数生长期 AsPC-1 及 PANC-1 细胞分别接种于 6 孔板中,待细胞贴壁后根据慢病毒感染复数(MOI)值在实验组 AsPC-1 及 PANC-1 细胞中加入适量的 microRNA-29c 腺病毒液,阴性对照组加入同等量的空载体,培养箱中培养 12 h 时换液,再培养 12 h 时用 TRIzol 试剂盒根据操作说明分别提取实验组和阴性对照组中 AsPC-1 及 PANC-1 中的总 RNA,测定总 RNA 浓度;采用实时定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 AsPC-1 及 PANC-1 中 microRNA-29c 的表达, microRNA-29c、内参 U6 逆转录引物和 RT-qPCR 相关上下游引物由广州锐博生物有限公司设计合成后提供,各组相对表达量采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算。

**1.2.3 检测细胞增殖** 采用 CCK-8 法,感染腺病毒 48 h 时收集 AsPC-1 及 PANC-1 细胞,以  $3 \times 10^3$  个/孔细胞接种于 96 孔板中,每组分别设 24、48 及 72 h 组,每个时间点设置 3 个复孔;检测前每孔分别加入 CCK-8 试剂 10  $\mu$ L,避光 37 °C 孵育 2 h,轻轻振荡后,酶标仪 450 nm 波长处测定光密度(OD)值,观察 microRNA-29c 对胰腺癌细胞增殖的影响。

**1.2.4 人胰腺癌细胞单克隆形成能力** 采用细胞平板克隆实验,感染腺病毒 24 h 后收集 AsPC-1 及 PANC-1 细胞,以  $1 \times 10^3$  个/孔细胞接种于 6 孔板中,每组设置 3 个复孔,连续 5 d 观察细胞状态;细胞经 4% 多聚甲醛固定 30 min,1% 结晶紫染色 30 min;PBS 洗 3 遍后干燥处理。数字拍摄成像,于显微镜下计数 >10 个细胞的克隆数,计算克隆形成率(%) = (克隆数/接种细胞数)  $\times$  100%。

### 1.3 统计学处理

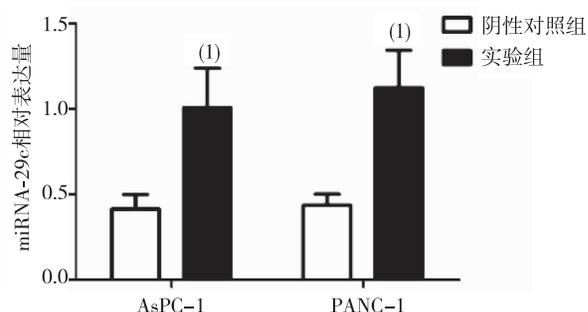
数据用 SPSS 22.0 统计软件处理,计数资料以  $(\bar{x} \pm s)$  表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。以  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 microRNA-29c 表达

microRNA-29c 腺病毒感染 AsPC-1 及 PANC-1 后,AsPC-1 及 PANC-1 实验组中 microRNA-29c 表达都明显增加,相对表达量分别为  $(1.004 \pm 0.234)$ 、 $(1.122 \pm 0.220)$ ;阴性对照组为  $(0.414 \pm 0.084)$ 、 $(0.436 \pm 0.065)$ ,两种细胞的实验组及阴

性对照组 microRNA-29c 相对表达量比较,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。



(1) 与同细胞阴性对照组比较,  $P < 0.05$

图1 感染 microRNA-29c 腺病毒后 AsPC-1 与 PANC-1 细胞内 microRNA-29c 的表达

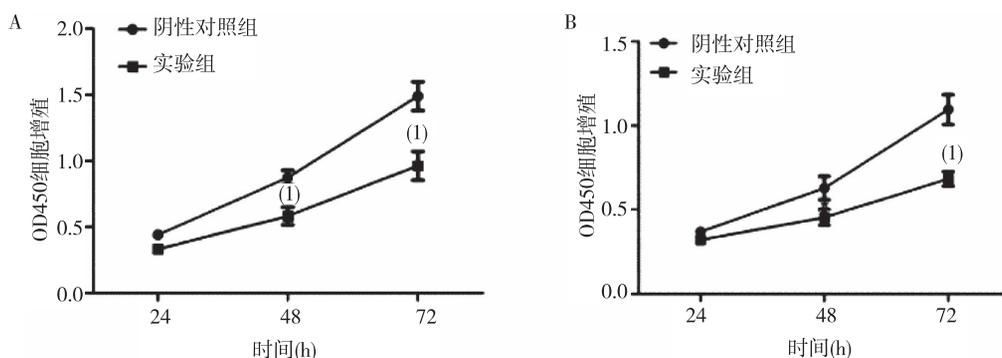
Fig. 1 MiR-29c adenovirus increased expression of miR-29c in AsPC-1 and PANC-1 cells

## 2.2 胰腺癌细胞的增殖能力

胰腺癌细胞 AsPC-1 及 PANC-1 感染 microRNA-29c 48 h 时, CCK8 法结果显示,与阴性对照组比较,实验组 AsPC-1 及 PANC-1 细胞的增殖能力均显著降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 2。表明上调 microRNA-29c 在胰腺癌细胞系中的表达可显著抑制胰腺癌细胞的增殖能力。

## 2.3 microRNA-29c 过表达对胰腺癌细胞克隆形成能力的影响

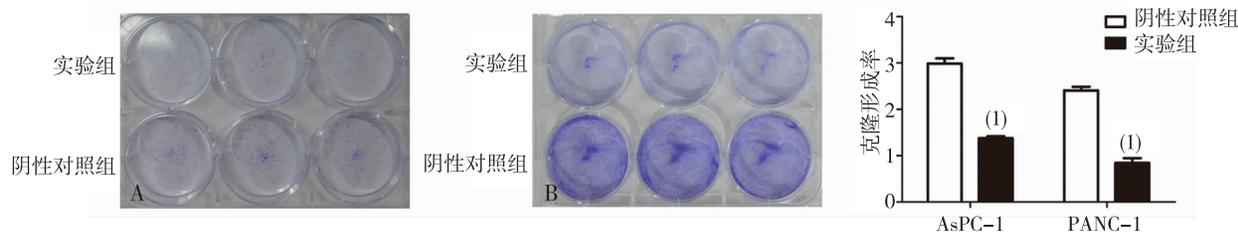
细胞平板克隆实验结果显示(图 3),实验组 AsPC-1 及 PANC-1 克隆形成率分别为( $1.38 \pm 0.023$ )、( $0.8 \pm 0.059$ );阴性对照组为( $2.96 \pm 0.065$ )、( $2.4 \pm 0.046$ ),两组比较,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ );提示 microRNA-29c 过表达的两种胰腺癌细胞的克隆形成能力明显受到抑制。



注:A 为 AsPC-1 细胞,B 为 PANC-1 细胞;(1) 与同细胞阴性对照组比较,  $P < 0.05$

图2 感染 microRNA-29c 腺病毒后 AsPC-1 与 PANC-1 细胞的增殖能力

Fig. 2 Over-expression of microRNA-29c inhibited PANC-1 and AsPC-1 cells proliferation ability



注:A 为 PANC-1 细胞,B 为 AsPC-1 细胞;(1) 与同细胞阴性对照组比较,  $P < 0.05$

图3 胰腺癌细胞 PANC-1 与 AsPC-1 的克隆形成能力

Fig. 3 Over-expression of microRNA-29c inhibited AsPC-1 and PANC-1 cells colony formation ability

## 3 讨论

microRNA 是一类长度约为 21 个碱基的非编码小分子 RNA,成熟的 microRNA 是由 60 ~ 80 个

碱基的发夹状双链 RNA 经 RNase III Dicer 酶剪切而来,至少 30% 的人类基因受到 microRNA 的调控<sup>[2-3]</sup>。大量研究表明 microRNA 在生物体内起到致癌或者抑癌作用,是通过调控致癌和抑癌基因的表达来实现的;在胰腺癌中,胰腺癌细胞的增殖和

生存就受到其调控,研究发现,microRNA-34a 在胰腺癌组织中的表达明显低于正常胰腺组织,microRNA-34a 通过影响胰腺癌细胞的细胞周期、DNA 修复及凋亡从而起到抑制肿瘤细胞的增殖作用<sup>[10]</sup>;同样也有研究表明 microRNA-34b 在胰腺癌组织中较癌旁组织明显下调,过表达 microRNA-34b 可抑制胰腺癌细胞的增殖能力<sup>[11]</sup>。而在对 microRNA-27a 和 microRNA-96 的研究时发现,它们在胰腺癌组织和细胞中表达明显升高,抑制其表达可明显抑制胰腺癌细胞的增殖,迁移和凋亡,是致癌的 microRNA<sup>[12-13]</sup>。本研究通过 microRNA-29c 过表达腺病毒分别感染胰腺癌 AsPC-1 及 PANC-1 细胞,观察 microRNA-29c 对人胰腺癌细胞增殖的影响。实验结果表明,感染 microRNA-29c 腺病毒的胰腺癌 AsPC-1 及 PANC-1 细胞中 microRNA-29c 的表达明显增强;进一步的 CCK-8 细胞增殖实验结果显示 microRNA-29c 过表达后的人胰腺癌细胞株 AsPC-1 及 PANC-1 增殖速率明显较阴性对照组下降;细胞平板克隆实验也证实了过表达 microRNA-29c 后胰腺癌 AsPC-1 及 PANC-1 细胞的单克隆增殖能力明显减弱,说明上调 microRNA-29c 在胰腺癌细胞系中的表达可显著抑制胰腺癌细胞的增殖能力,细胞克隆的形成能力也明显受到抑制。

综上,microRNA-29c 作为新发现的抑癌 microRNA 分子,也可有效抑制胰腺癌 AsPC-1 及 PANC-1 细胞的生长,可能成为胰腺癌的治疗新靶标。为后续探讨 microRNA-29c 参与胰腺癌生物学行为的分子机制提供指导,也为胰腺癌的分子靶向治疗提供新的策略。

#### 4 参考文献

- [1] Hernandez BY, Green MD, Cassel KD, et al. Preview of hawaii Cancer facts and figures 2010[J]. Hawaii Med J, 2010 (9): 223 - 224.
- [2] Kosik KS. The neuronal microRNA system[J]. Nat Rev Neurosci, 2006 (12): 911 - 920.
- [3] Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, et al. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs[J]. Nature, 2008 (7209): 58 - 63.
- [4] Petri A, Lindow M, Kauppinen S. MicroRNA silencing in primates: Towards development of novel therapeutics[J]. Cancer Res, 2009 (2): 393 - 395.
- [5] Leidner RS, Li L, Thompson CL. Dampening enthusiasm for circulating microRNA in breast cancer[J]. PLoS One, 2013 (3): e57841 - e57851.
- [6] Xiang R, Lei H, Chen M, et al. The miR1792 cluster regulates FOG2 expression and inhibits proliferation of mouse embryonic cardiomyocytes [J]. Braz J Med Biol Res, 2012 (45): 131138.
- [7] Sluijter JP, van Mil A, van Vliet P, et al. MicroRNA1 and 499 regulate differentiation and proliferation in human-derived cardiomyocyte progenitor cells [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010 (30): 859868.
- [8] Li Y, Kowdley KV. MicroRNAs in common human diseases[J]. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2012 (10): 246253.
- [9] Yu HW, Sze DM, Cho WC. MicroRNAs involved in anti-tumour immunity [J]. Int J Mol Sci, 2013 (3): 5587 - 5607.
- [10] Ji Q, Hao X, Zhang M, et al. MicroRNA miR-34 inhibits human pancreatic cancer tumor-initiating cells [J]. PLoS one, 2009 (8): e6816.
- [11] Liu C, Cheng H, Shi S, et al. MicroRNA-34b inhibits pancreatic cancer metastasis through repressing Smad3 [J]. Current Molecular Medicine, 2013 (4): 467 - 478.
- [12] Ma Y, Yu S, Zhao W, et al. miR-27a regulates the growth, colony formation and migration of pancreatic cancer cells by targeting Sprouty2 [J]. Cancer Letters, 2010 (2): 150 - 158.
- [13] Yu S, Lu Z, Liu C, et al. miRNA-96 suppresses KRAS and functions as a tumor suppressor gene in pancreatic cancer [J]. Cancer Research, 2010 (14): 6015 - 6025.

(2016-05-28 收稿, 2016-08-25 修回)

中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 赵毅