

miRNA-1181 抑制人胰腺癌细胞的增殖^{*}

王 杰, 喻 超, 周显飞, 朱昌豪, 黄 巍, 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 miRNA-1181 (miR-1181) 对人胰腺癌细胞增殖能力的影响。方法: 采用实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测 miR-1181 在 4 株人胰腺癌细胞系及 1 株人正常胰腺上皮细胞系中的表达, 选取 miR-1181 表达差异较明显的 PANC-1 和 MIA PaCa-2 细胞系进行后续实验; 构建 miR-1181 过表达慢病毒载体 (miR-1181U) 以及空载慢病毒载体 (NC), 采用 qRT-PCR 检测感染效率; 在体外采用 CCK-8 实验, 平板克隆实验检测 miR-1181 对胰腺癌细胞增殖能力的影响; 建立裸鼠皮下成瘤模型, 用免疫组化实验检测 miR-1181 对胰腺癌细胞成瘤能力的影响。结果: qRT-PCR 显示 4 株胰腺癌细胞系中 miR-1181 表达量低于正常胰腺上皮细胞 ($P < 0.05$); 过表达 miR-1181 后 PANC-1 和 MIA PaCa-2 细胞增殖能力明显受到抑制 ($P < 0.05$), 细胞集落形成数量明显减少 ($P < 0.05$); 裸鼠皮下成瘤模型显示过表达 miR-1181 后肿瘤体积及免疫组化指标 Ki67 均明显低于对照组 ($P < 0.05$)。结论: 过表达的 miR-1181 能在体内体外抑制胰腺癌细胞的增殖, 有望成为胰腺癌治疗的新靶点。

[关键词] 胰腺肿瘤; 细胞; 增殖; 慢病毒感染; 微小 RNA; miR-1181

[中图分类号] R735.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2016)12-1382-05

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2016.12.004

The Inhibiting Effect of miRNA-1181 on Cell Proliferation of Pancreatic Cancer Cell

WANG Jie, YU Chao, ZHOU Xianfei, ZHU Changhao, HUANG Wei, JIANG Jianxin

(Department of Hepatic-Biliary-Pancreatic Surgery, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of microRNA-1181 on the proliferation of pancreatic cancer. **Methods:** Quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was adopted to detect the expression of miR-1181 in 4 human pancreatic cancer cell lines and 1 human normal pancreatic epithelial cell lines. The PANC-1 and MIA PaCa-2 cell lines with significantly different miR-1181 expression were selected for subsequent experiments. The miR-1181 over-expression lentiviral vector (miR-1181U) and the empty lentiviral vector vector (NC) were constructed and qRT-PCR was used to detect infection efficiency. The effect of miR-1181 on the proliferation of pancreatic cancer cells was detected by CCK-8 assay and Plate cloning experiment in vitro. The subcutaneous tumor model of nude mice was established, and the effect of miR-1181 on the ability of pancreatic cancer cells was detected by immunohistochemistry. **Results:** qRT-PCR showed that the expression of miR-1181 in 4 pancreatic cancer cell lines was significantly lower than that in normal pancreatic epithelial cells ($P < 0.05$). The proliferation ability of PANC-1 and MIA PaCa-2 cells was significantly inhibited after over-expression of miR-1181 ($P < 0.05$), and the number of colony formation was significantly decreased ($P < 0.05$). Subcutaneous tumor model in nude mice showed that the tumor size and immunohistochemistry index

^{*} [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(81160311, 81572429, 81660483)

^{**} 通信作者 E-mail: jyx731003@163.com

网络出版时间: 2016-12-15 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20161215.1534.005.html>

Ki67 were significantly lower than those in the normal control group ($P < 0.05$) after over-expression of miR-1181. **Conclusion:** Over-expression of miR-1181 can inhibit the proliferation of pancreatic cancer cells in vitro and in vivo, and is expected to become a new target for the treatment of pancreatic cancer.

[**Key words**] pancreatic neoplasms; cells; proliferation; lentivirus infections; micro RNA; miR-1181

胰腺癌因其早期不易诊断,治疗效果差,预后不理想,被誉为致死性最高的消化道恶性肿瘤之一^[1],因此早期精确的诊断以及新型的治疗手段对胰腺癌的诊治尤其重要^[2]。miRNA 是一类非编码的微小 RNA,可以在转录后或者翻译水平与靶 mRNA 结合,使其降解并抑制基因的表达从而参与调控细胞的一系列生物行为^[3]。本课题组前期研究表明 miR-1181 能抑制肿瘤干细胞成球形成率以及肿瘤干细胞标记物 CD133 的表达,并且能减少侧群细胞的形成^[4];还有研究表明 miR-1181 可通过直接抑制 SOX2 和 STAT3 来抑制肿瘤干细胞的干扰^[4],本研究主要探讨 miR-1181 对胰腺癌细胞增殖的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株及试剂 人胰腺癌细胞株 AsPC-1、BxPC-3、PANC-1、MIA PaCa-2 以及人正常胰腺导管上皮细胞株 HPDE 由华中科技大学附属同济医院胆胰外科实验室馈赠,高糖 DMEM 培养基、RPMI 1640 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司,慢病毒载体由上海吉凯公司负责包装和构建,CCK-8 试剂盒购自日本同仁化学研究所,Ki67 抗体购自美国 CST 公司。

1.1.2 动物 免疫缺陷小鼠 (Balb/c nude mice) 购于北京华阜康生物科技股份有限公司,雌性,4 周龄,体质量 14 ~ 15 g。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人正常胰腺导管上皮细胞 HPDE、人胰腺癌细胞 AsPC-1、BxPC-3 用 RPMI 1640 培养基(含 10% FBS),置于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱培养,人胰腺癌细胞 PANC-1 和 MIA PaCa-2 用高糖 DMEM 培养基(含 10% FBS),置于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱培养。

1.2.2 miR-1181 在人胰腺癌及正常胰腺细胞中的表达 根据 Trizol 说明书提取各类细胞中总 RNA,选取吸光度为 1.8 ~ 2.0 (A260/A280) 的样

本用于实验。再根据逆转录试剂盒说明书,以 U6 作为内参,分别逆转录为 cDNA,逆转录反应为 25 μL 反应体系,反应条件为 70 °C 10 min,42 °C 50 min,70 °C 10 min,4 °C 保存。以 U6 作为内参,实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 反应为 25 μL 反应体系,反应条件为 95 °C 15 min,94 °C 15 s,55 °C 30 s,70 °C 30 s,45 个循环。采用相对定量法 (relative quantitative, RQ) 表示 miR-1181 的表达量。

1.2.3 慢病毒感染及效率检测 根据 PCR 结果选取两株胰腺癌细胞系,待其贴壁生长至 70% ~ 80% 融合时,用 0.05% 胰酶消化传代培养,按慢病毒感染手册感染胰腺癌细胞。实验分为过表达组 (miR-1181U),阴性对照组 (NC) 和空白对照组 (BC) 3 组,待其感染 1 周后采用 RT-PCR 检测感染效率。

1.2.4 CCK-8 实验 制备细胞悬液,调整细胞密度为 1×10^8 个/L,接种到 96 孔板中,每孔约 100 μL 细胞悬液,每个样约 5 个副孔。分别于 4、24、48、72、96 h 加入含 10% CCK8 的培养液,培养 3 h 后测定波长为 450 nm 时每孔的吸光度。

1.2.5 平板克隆实验 收集对数生长期细胞,调整细胞悬液浓度为 1×10^6 个/L,于六孔板中种植 2 000 个细胞,37 °C 培养箱中培养 7 ~ 8 d 后,4% 多聚甲醛固定 30 min,0.1% 结晶紫染色 30 min,计数每孔克隆形成数量并拍照记录。

1.2.6 裸鼠皮下成瘤模型 将 6 只裸鼠随机分成阴性对照组 (NC 组) 和过表达组 (miR-1181U 组),分别收集对数生长期稳定表达的细胞,用 PBS 重悬后弃上清,再将 PBS 与 Matrigel 基质胶按 1:1 体积混合,将混合液重悬并调整细胞浓度为 1×10^{10} 个/L,于每只裸鼠的右后腿部皮下注射 200 μL 细胞悬液。在相同条件下(间断 12 h 光照与黑暗,自由进食等)饲养 6 周,每周观察 1 次裸鼠,记录裸鼠体质量及肿瘤大小。6 周后采用颈部脱臼法处死裸鼠,解剖裸鼠取出肿瘤并拍照。

1.2.7 Ki67 在裸鼠肿瘤中的表达 将解剖后的裸鼠肿瘤组织用 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋,HE 染色;将细胞增殖相关蛋白 Ki67 按 1:400 稀释后染色。每组肿瘤切片随机选取 5 张切片,每张切片

随机选取 3 个视野,观察并拍照。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 对实验数据进行分析、整理,计量资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$),两组间分析采用 t 检验,各组间差异采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

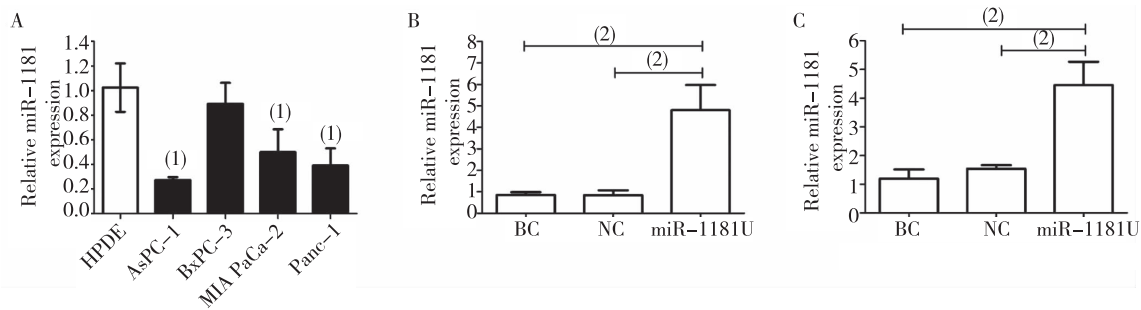
2.1 miR-1181 的表达

与正常胰腺导管上皮细胞 HPDE 相比,4 株胰

腺癌细胞 miR-1181 均为低表达,其中 AsPC-1、PANC-1、MIA PaCa-2 细胞株中 miR-1181,显著低于 HPDE 细胞株,差异有统计学意义($P < 0.05$)。BxPC-3 细胞株中 miR-1181 表达量与 HPDE 比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 1A。

2.2 miR-1181 慢病毒在胰腺癌中的感染效率

根据细胞系表达情况,选取 PANC-1 和 MIA PaCa-2 作为实验所用细胞系,并感染慢病毒。PANC-1、MIA PaCa-2 两株细胞 miR-1181U 组均比 BC 组和 NC 组显著升高($P < 0.05$),见图 1B, 1C。



注:A 为 miR-1181 在胰腺癌细胞系中低表达,B 为 PANC-1 感染慢病毒后各组 miR-1181 的表达,

C 为 MIA PaCa-2 感染慢病毒后各组 miR-1181 的表达;⁽¹⁾ $P < 0.05$,⁽²⁾ $P < 0.01$

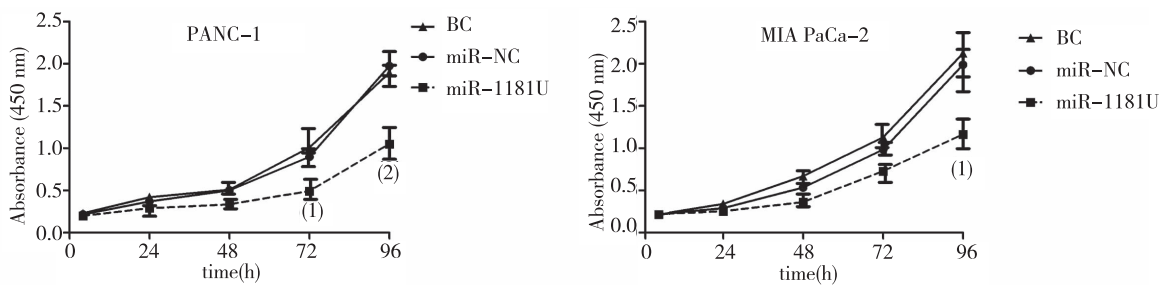
图 1 qRT-PCR 检测 miR-1181 表达

Fig. 1 MiR-1181 expression evaluated by PCR

2.3 miR-1181 对胰腺癌细胞增殖能力的影响

当 PANC-1 细胞培养 72 h 及 96 h 时,miR-1181U 组吸光度值较 NC 组和 BC 组明显降低,差异

有统计学意义($P < 0.05$,图 2A);当 MIA PaCa-2 细胞培养 96 h 时,miR-1181 组吸光度值较 NC 组和 BC 组明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 2B)。



注:A 为 PANC-1 细胞系,B 为 MIA PaCa-2 细胞系;⁽¹⁾ $P < 0.05$

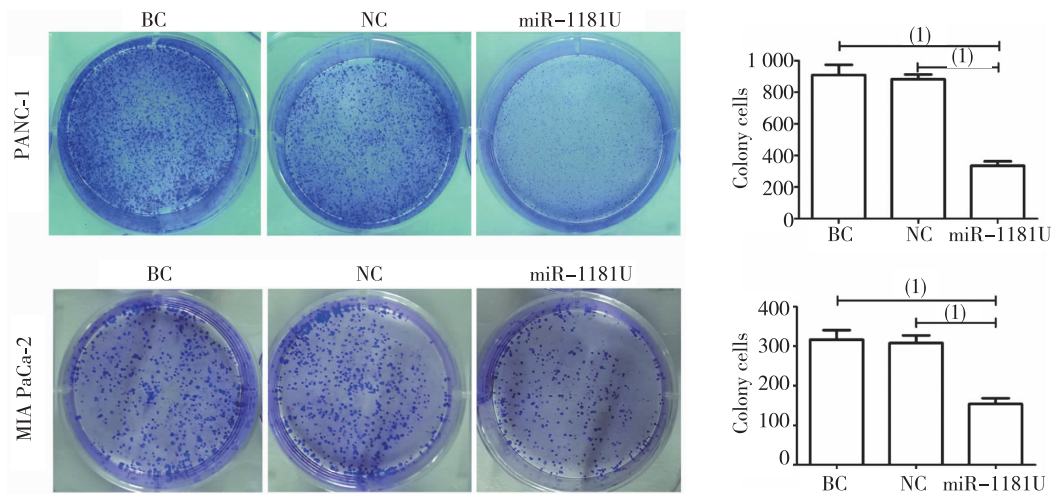
图 2 miR-1181U 对胰腺癌细胞增殖能力的影响(CCK-8)

Fig. 2 The effect of miR-1181U on proliferation of pancreatic cancer cells

2.4 miR-1181 对胰腺癌细胞集落形成的影响

平板克隆实验结果显示,miR-1181U 组集落形成数量 PANC-1 为(334.7 ± 16.48),MIA PaCa-2 为(153.7 ± 8.51);NC 组集落形成数量 PANC-1 为(917.0 ± 37.58),MIA PaCa-2 为(308.0 ± 11.15);

BC 组集落形成数量 PANC-1 为(910.7 ± 36.99),MIA PaCa-2 为(316.7 ± 13.16);miR-1181U 组较 NC 组及 BC 组集落形成数量均明显减少,差异均有统计学意义($P < 0.05$,图 3)。



注: ⁽¹⁾ $P < 0.05$

图3 miR-1181U 对胰腺癌细胞克隆形成的影响(平板克隆)

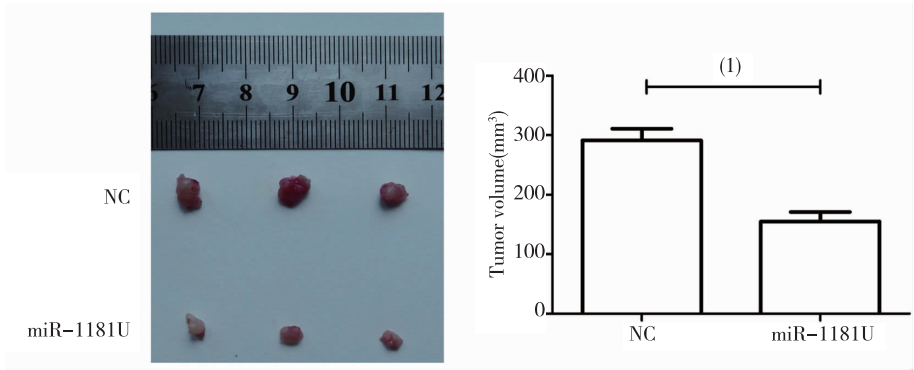
Fig. 3 The effect of miR-1181U on colony forming of pancreatic cancer cells

2.5 miR-1181 对胰腺癌细胞体内成瘤的影响

裸鼠每组 3 只,注射细胞悬液后饲养 6 周,取出肿瘤,测定肿瘤体积 volume (mm³),miR-1181U 组(155.3 ± 9.03)mm³,NC 组(291.0 ± 11.37)mm³,miR-1181U 组较 NC 组肿瘤体积明显变小,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 4)。

2.6 miR-1181 对肿瘤增殖膜指标 Ki67 的影响

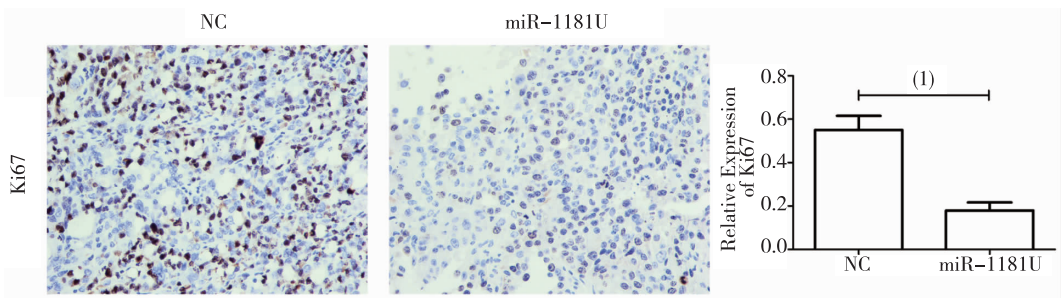
免疫组化结果显示,Ki67 的相对表达量 miR-1181U 组为(0.18 ± 0.02),NC 组为(0.55 ± 0.03),miR-1181U 组 Ki67 表达量明显低于 NC 组,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 5)。



(1) $P < 0.05$

图4 miR-1181 裸鼠皮下成瘤能力

Fig. 4 Subcutaneous tumor formation in nude mice to detect subcutaneous tumor forming ability of miR-1181



(1) $P < 0.05$

图5 miR-1181 对增殖指标 Ki67 的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 5 The effect of miR-1181on Ki67 expression

3 讨论

近期研究显示,约 30% 的蛋白编码基因受 miRNA 所调控,每条 miRNA 都能特异性结合靶基因 mRNA 的 3'-UTR 序列,从而参与调控成千上万的基因表达^[5]。miRNA 作为一种转录后调控序列,参与机体的各种生理功能,如胚胎发育,细胞增殖以及细胞凋亡等。miRNA 的异常表达在疾病发生、发展包括肿瘤形成过程中起到了显著的作用^[6]。有研究表明,miRNA-330-5p 在结肠癌中表达量明显低于癌旁组织,当过表达 miR-330-5p 后能显著抑制结肠癌细胞的增殖能力,并通过“双荧光素酶报告分析”确定人整合素 5 (ITGA5)是其直接作用靶基因^[7]。Pei YF 等^[8]研究发现,miR-29a 不仅能促进乳腺癌细胞的增殖,还能促进乳腺癌上皮细胞向间(充)质细胞转化进而获得迁徙能力。而在胰腺癌的报道中,Tanaka R 等^[9]研究发现 miR-17-92 能通过 MEK-ERK 信号通路影响胰腺癌细胞 MIA PaCa-2 的细胞周期,阻滞细胞从 G1 期进入到 S 期,进而影响增殖能力。Chang W 等^[10]通过癌症基因组图谱中发现 miR-377 在胰腺癌中呈低表达,并实验证实 miR-377 在组织及细胞中均呈低表达,进一步确定 Pim-3 为其直接作用靶点,miR-377 通过抑制 Pim-3 的表达来抑制胰腺癌细胞的增殖。迄今为止,对 miR-1181 的研究甚少,只在卵巢癌和肝癌报道中有所提及^[11-12]。本课题组前期研究只表明 miR-1181 能影响胰腺癌细胞干性^[4],并未直接阐明 miR-1181 对胰腺癌细胞生物学效应的影响。另一方面,miR-1181 的直接作用靶蛋白尚未明确,是否通过影响某些通路(如 MAPK 通路,PI3K/AKT 通路和 Hedgehog 通路)进而影响细胞的增殖,均需进一步实验探究^[13-15]。

本研究重点从体内体外两方面说明 miR-1181 对胰腺癌细胞的增殖有明显影响。体外采用 CCK-8 实验、平板克隆实验分别表明 miR-1181 能抑制胰腺癌细胞的增殖以及减少克隆集落的形成。体内建立裸鼠皮下成瘤模型证实 miR-1181 能抑制胰腺癌细胞的体内成瘤,且肿瘤免疫组化切片显示 miR-1181 能抑制 Ki67 的表达。故我们可以得出结论,miR-1181 能抑制胰腺癌细胞的增殖。

综上,miR-1181 在胰腺癌中是作为一种抑癌基因的形式而存在的,能显著抑制胰腺癌细胞体外

增殖以及体内成瘤,为进一步研究其具体机制提供了一定的理论基础,miR-1181 有望成为胰腺癌诊治的潜在靶点。

4 参考文献

- [1] Hidalgo M. Pancreatic cancer[J]. N Engl J Med, 2010 (17): 1605 - 1617.
- [2] Szafranska AE, Davison TS, John J, et al. MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. Oncogene, 2007(30): 4442 - 4452.
- [3] Jiang B, Mu W, Wang J, et al. MicroRNA-138 functions as a tumor suppressor in osteosarcoma by targeting differentiated embryonic chondrocyte gene [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2016 (1): 69.
- [4] Jiang J, Li Z, Yu C, et al. MiR-1181 inhibits stem cell-like phenotypes and suppresses SOX2 and STAT3 in human pancreatic cancer[J]. Cancer Lett, 2015(2): 962 - 970.
- [5] Schultz NA, Dehlendorff C, Jensen BV, et al. MicroRNA biomarkers in whole blood for detection of pancreatic cancer[J]. JAMA, 2014(4): 392 - 404.
- [6] Ambros V. The functions of animal microRNAs[J]. Nature, 2004(7006): 350 - 355.
- [7] Yoo HI, Kim BK, Yoon SK. MicroRNA-330-5p negatively regulates ITGA5 expression in human colorectal cancer [J]. Oncol Rep, 2016 (2):280.
- [8] Pei YF, Lei Y, Liu XQ. MiR-29a promotes cell proliferation and EMT in breast cancer by targeting ten eleven translocation [J]. Biochim Biophys Acta, 2016 (11): 2177 - 2185.
- [9] Tanaka R, Tomosugi M, Sakai T, et al. MEK inhibitor suppresses expression of the miR-17-92 cluster with G1-phase arrest in HT-29 human colon cancer cells and MIA PaCa-2 pancreatic cancer cells [J]. Anticancer Res, 2016(9): 4537 - 4543.
- [10] Chang W, Liu M, Xu J, et al. MiR-377 inhibits the proliferation of pancreatic cancer by targeting Pim-3 [J]. Tumour Biol, 2016 (5):537 - 539.
- [11] Zhang HY, Li JH, Li G. Activation of ARK5/miR-1181/HOXA10 axis promotes epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer[J]. Oncol Rep, 2015(3): 1193 - 1202.
- [12] Liu X, Wang T, Wakita T, et al. Systematic identification of microRNA and messenger RNA profiles in hepatitis C virus-infected human hepatoma cells[J]. Virology, 2010(1): 57 - 67.

(下转第 1392 页)

转录激活上发挥了关键性的作用^[13]。目前已发现 STAT 家族有 6 个成员, STAT3 是家族中最普遍存在的, 当接受细胞因子或者生长因子刺激后, STAT3 作用于细胞核内以二聚体的形式特异性结合 DNA 片段, 调控目的基因的转录。如果通路持续激活, 将导致细胞的恶性增殖以及周边侵袭^[13]。STAT3 能通过各种靶基因促进肿瘤的发生、发展, 包括细胞周期调控因子, 血管生成因子以及抗凋亡基因等^[14]。

本研究通过 transwell 实验, 细胞划痕实验初步验证了 miR-1181 能抑制胰腺癌的侵袭转移能力。并通过 western bolt 观察了 miR-1181 对靶蛋白 STAT3 的影响, 即过表达 miR-1181 能抑制 STAT3 的表达, 低表达 miR-1181 能促进 STAT3 的表达。进一步我们人为干扰了 STAT3 的表达后, 发现 miR-1181D 组的促进作用被抑制。免疫荧光实验结果显示, 在 PANC-1 细胞中过表达 miR-1181 后, F-肌动蛋白(F-actin)被剪切, 呈现低表达, 导致其运动结构和极性的缺失, 从而迁移能力变弱。miR-1181U 组 F-肌动蛋白和 β -微管蛋白较 NC 及 BC 组明显减少, BC 组和 NC 组中, F-actin 不被剪切, 大量聚集形成伪足和极性, 为间充质移动方式向阿米巴样移动方式的转变过程提供所必须的运动结构和极性, 故迁移能力强。综上我们可以得出结论, miR-1181 能通过抑制 STAT3 的表达来影响胰腺癌细胞的侵袭转移能力。

总之, miR-1181 在胰腺癌中作为一种抑癌基因, 能抑制胰腺癌细胞的侵袭转移, 有望成为治疗胰腺癌的新靶点。

4 参考文献

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2013(1): 11–30.
- [2] Erratum for PMID 21180585[J]. Therap Adv Gastroen-

terol, 2012(5): 371.

- [3] Hidalgo M. Pancreatic cancer[J]. N Engl J Med, 2010(17): 1605–1617.
- [4] Ambros V. The functions of animal microRNAs[J]. Nature, 2004(6): 350–355.
- [5] Jiang J, Li Z, Yu C, et al. MiR-1181 inhibits stem cell-like phenotypes and suppresses SOX2 and STAT3 in human pancreatic cancer[J]. Cancer Lett, 2015(2): 962–970.
- [6] Humeau M, Torrisani J, Cordelier P. miRNA in clinical practice: pancreatic cancer [J]. Clin Biochem, 2013(10): 933–936.
- [7] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function[J]. Cell, 2004(2): 281–297.
- [8] He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation[J]. Nat Rev Genet, 2004(7): 522–531.
- [9] Szafranska AE, Davison TS, John J, et al. MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. Oncogene, 2007(30): 4442–4452.
- [10] Zhang B, Ji S, Ma F, et al. miR-489 acts as a tumor suppressor in human gastric cancer by targeting PROX1 [J]. Am J Cancer Res, 2016(9): 2021–2030.
- [11] Wang C, Liu P, Wu H, et al. MicroRNA-323-3p inhibits cell invasion and metastasis in pancreatic ductal adenocarcinoma via direct suppression of SMAD2 and SMAD3[J]. Oncotarget, 2016(12): 14912–14924.
- [12] Zhao C, Li H, Lin HJ, et al. Feedback Activation of STAT3 as a Cancer Drug-Resistance Mechanism [J]. Trends Pharmacol Sci, 2016(1): 47–61.
- [13] Niit M, Hoskin V, Carefoot E, et al. Cell-cell and cell-matrix adhesion in survival and metastasis: Stat3 versus Akt[J]. Biomol Concepts, 2015(5): 383–399.
- [14] Wake MS, Watson CJ. STAT3 the oncogene-still eluding therapy[J]. FEBS J, 2015(14): 2600–2611.

(2016-09-16 收稿, 2016-11-13 修回)

中文编辑: 刘平; 英文编辑: 苏晓庆

(上接第 1386 页)

- [13] Ji S, Qin Y, Shi S, et al. ERK kinase phosphorylates and destabilizes the tumor suppressor FBW7 in pancreatic cancer[J]. Cell Res, 2015(5): 561–573.
- [14] Mao Y, Xi L, Li Q, et al. Regulation of cell apoptosis and proliferation in pancreatic cancer through PI3K/Akt pathway via Polo-like kinase [J]. Oncol Rep, 2016

(1): 49–56.

- [15] Bai Y, Bai Y, Dong J, et al. Hedgehog signaling in pancreatic fibrosis and cancer[J]. Medicine (Baltimore), 2016(10): 2996.

(2016-10-06 收稿, 2016-11-28 修回)

中文编辑: 刘平; 英文编辑: 刘华