

# microRNA-100 对胰腺癌细胞侵袭和转移能力的影响及机制\*

黄巍<sup>1,2</sup>, 孙诚谊<sup>1,2</sup>, 喻超<sup>1,2</sup>, 潘耀振<sup>1,2</sup>, 田舍<sup>1,2</sup>, 张乙凡<sup>1,2</sup>, 陈世裕<sup>1,2</sup>, 江建新<sup>2,3,4,\*</sup>

(1. 贵州医科大学附院 肝胆外科, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学 肝胆胰脾重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 3. 武汉大学人民医院, 湖北 武汉 430060; 4. 湖北省消化病学研究所, 湖北 武汉 430060)

**[摘要]** 目的: 探讨 miR-100 对胰腺癌细胞在体外侵袭和迁徙能力的影响及其机制。方法: 采用实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测 miR-100 在 6 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, 选取表达差异较明显的 PANC-1 和 MIA PaCa-2 细胞系进行后续实验; 针对 miR-100 设计 miR-100 mimic 和空载体 (NC), 并转染上述两株细胞系中, 用 PCR 检测转染效率; Transwell 实验及划痕实验检测 miR-100 对胰腺癌细胞侵袭转移能力的影响, 免疫荧光检测 miR-100 对胰腺癌细胞骨架的影响, Western blot 检测转染细胞后 FZD-8 的表达。结果: PCR 实验显示 miR-100 在胰腺癌细胞系中低表达, 在正常胰腺上皮细胞系中高表达, 所设计的 miR-100 mimic 可以有效地升高 PANC-1 和 MIA PaCa-2 细胞系中 miR-100 的表达; Transwell 实验及划痕实验显示转染 miR-100 之后, 能有效的抑制胰腺癌细胞的侵袭及迁移能力 ( $P < 0.05$ ); 免疫荧光显示转染 miR-100 后, F-肌动蛋白 (F-actin) 减少; Western blot 结果显示, 转染 miR-100 后, FZD-8 的表达减少, 胰腺癌细胞的侵袭转移能力明显降低。结论: 上调 miR-100 后, 胰腺癌细胞可能通过下调 FZD-8 的表达来抑制其侵袭转移的能力, 提示 miR-100 有望成为胰腺癌治疗的潜在靶点。

**[关键词]** 胰腺肿瘤; miR-100; 侵袭; 转移

**[中图分类号]** R735.6; R361.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2017)07-0749-05

**DOI:** 10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.07.002

## Effects and Mechanisms of microRNA-100 on Migration and Invasion in Pancreatic Carcinoma Cells

HUANG Wei<sup>1</sup>, SUN Chengyi<sup>1</sup>, YU Chao<sup>1</sup>, PAN Yaozhen<sup>1</sup>, TIAN She<sup>1</sup>, ZHANG Yifan<sup>1</sup>, CHEN Shiyu<sup>1</sup>, JIANG Jianxin<sup>2,3</sup>

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China;

2. Key Laboratory of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China;

3. People's Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei, China; 4. Hubei Provincial Institute of Digestive Diseases, Wuhan 430060, Hubei, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects and mechanisms of miR-100 on migration and invasion in pancreatic carcinoma cells. **Methods:** qRT-PCR was used to detect the expression of miR-100 in 6 human pancreatic cancer cell lines and one human normal pancreatic epithelial cell line. Selecting the cell with obvious expression difference PANC-1 and MIA PaCa-2 for further experiments. miR-100

\*[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(81560477); 贵州省科学技术基金[黔科合 J 字(2015)2013 号]; 贵州省第四批人才基地基金资助[黔省专合字(2012)94 号]; 贵州省科学技术厅-贵阳医学院院士工作站肝胆外科分站[黔科合院士站(2015)4013]; 贵州省高层次人才创新创业计划“十”层次人才[黔科合平台人才(2016)5647]; 贵州省孙诚谊“肝胆胰脾疾病诊治”研究生导师工作室[黔教研合 GZS(2016)09]; 贵州省肝胆外科临床医学研究中心[黔科合平台人才(2017)5404]

\*\*通信作者 E-mail: jxx731003@163.com

网络出版时间: 2017-07-13 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20170713.2304.004.html>

mimic and NC were designed and transfected into the above two cell lines. PCR was used to detect the transfection efficiency. Transwell assay and wound healing assay were used to detect the effects of miR-100 on pancreatic cancer cells invasion and metastasis ability. The influence of miR-100 on cytoskeleton was detected by immunofluorescence. The expression of FZD-8 was detected by Western blot. **Results:** PCR assay showed that miR-100 in pancreatic carcinoma cells with low expression in and high expression in normal pancreatic epithelial cell lines. PCR showed that the designed miR-100 mimic could effectively improve the expression of miR-100 in PANC-1 and MIA PaCa-2 cell lines. Transwell assay and wound healing assay showed that transfected miR-100 could effectively inhibit the invasion and metastasis of pancreatic cancer cells ( $P < 0.05$ ). Immunofluorescence showed a decrease in F-actin after transfected miR-100. Western blot showed that the expression of FZD-8 was decreased and the invasion and metastasis of pancreatic cancer cells were significantly decreased after transfected miR-100. **Conclusion:** After improved miR-100, pancreatic cancer cells may inhibit invasion and metastasis by down-regulating the expression of FZD-8. It was suggested that miR-100 could be expected to be a potential target for the treatment of pancreatic cancer.

[**Key words**] pancreatic cancer; miR-100; invasion; migration; FZD-8

胰腺癌是消化系统常见的恶性肿瘤,其发病率在全世界呈现逐渐上升的趋势<sup>[1]</sup>。从最近几年的数据中显示,胰腺癌已成为第 10 大常见恶性肿瘤,在恶性肿瘤患者的死因中位列第 4 位<sup>[2]</sup>。胰腺癌的恶性程度极高,在发病早期就极易发生局部侵袭和远处转移,临床确诊时多属于晚期阶段,是预后最差的恶性肿瘤之一<sup>[3]</sup>。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是在真核生物中发现的一类内源性的具有调控功能的非编码 RNA,长约 20 ~ 25 个核苷酸,可通过对靶基因转录的调控进而影响肿瘤细胞的增殖、侵袭转移及凋亡等进程<sup>[4]</sup>。近年来,miR-100 的功能及其作用机制受广泛关注,本研究通过体外细胞学实验分析 miR-100 对胰腺癌细胞侵袭和迁徙能力的影响,揭示 miR-100 在胰腺癌细胞侵袭转移中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞株和制剂

人胰腺癌细胞系细胞株以及胰腺正常上皮细胞株,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,miR-100 mimic 及空载体(NC)由广州锐博生物科技有限公司构建,PCR 相关 SYBR Premix 试剂购自上海生工生物有限公司,Transwell 小室及 6 孔板购自美国 Corning 公司,FZD-8 抗体购自美国 CST 公司,鬼笔环肽及

DAPI 购自美国 Sigma 公司,Matrigel 基质胶购于美国 BD 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 培养条件为 10% 胎牛血清的培养基、37 °C、5% CO<sub>2</sub>;细胞于培养箱中培养,根据细胞的生长情况于 2 ~ 3 d 换新鲜培养基继续培养或细胞传代培养,分别取两种细胞株细胞提取 RNA,用 PCR 检测 miR-100 的表达。

**1.2.2 miR-100 mimic 转染** 根据上述结果,选取差异最大的 PANC-1 和 MIA PaCa 细胞制备细胞悬液,以密度为  $3.5 \times 10^5$  个/mL,分别接种于 4 个 6 cm 培养皿中,待细胞数量在 70% 左右时,分别将 miR-100 mimic 和 NC 转染入每个皿中,24 h 后换液,48 h 提取 RNA,用 PCR 验证转染效率。

**1.2.3 Transwell 小室侵袭和迁徙实验** (细胞迁徙实验步骤同侵袭实验,但未加入 Matrigel 基质胶) Matrigel 基质胶用无血清培养基按 1:8 稀释,加入小室上室面,于 37 °C 30 min 水化基底膜。制备转染 48 h 后的 PANC-1 和 MIA PaCa-2 细胞悬液(用不含血清的培养基重悬),密度为  $2 \times 10^5$  个/mL,每个小室中加入 200  $\mu$ L,下室加入含 10% 血清培养基 600  $\mu$ L,置于培养箱中培养 24 ~ 36 h 后,用 PBS 洗 2 遍,4% 多聚甲醛固定 30 min,0.1% 结晶紫染色 30 min,用棉签擦去上室面细胞,晾干,拍照。

**1.2.4 细胞划痕实验** 将未处理的 PANC-1 和 MIA PaCa-2 细胞分别种于 6 孔板中,待细胞长到 60% 时进行转染,待细胞长满时,用 tip 枪头垂直划

几条直线,并在 0、48 h 分别在倒置显微镜下观察。

**1.2.5 细胞骨架免疫荧光** 将转染后的 PANC-1 和 MIA PaCa-2 细胞爬片,密度为  $1.5 \times 10^5$  个/mL,待其贴壁后进行固定、破膜、封闭。制备 1:50 的荧光素鬼笔环肽置于玻片上染色 2 h 后,用 PBS 洗脱;再用 DAPI 染色 5 ~ 10 min 后,再次洗脱并封片,于共聚焦激光显微镜下观察。

**1.2.6 FZD-8 蛋白表达的测定** 按照蛋白提取试剂盒提取转染 48 ~ 72 h 后的 PANC-1 和 MIA PaCa-2 细胞蛋白,根据定量结果加样,然后电泳、转膜、封闭、孵一抗 4 ℃ 过夜、洗膜、孵二抗 2 h、再洗膜、曝光,用 Image Lab 软件分析灰度值。

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 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ),同一时间段不同浓度组间采用单因素方差分析,不同时间段不同浓度组间采用重复测量方差分析,以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-100 表达

分别提取 6 株人胰腺癌细胞系和 1 株人正常胰腺上皮细胞系中的 RNA,PCR 结果显示,与正常胰腺上皮细胞相比,miR-100 在胰腺癌细胞系中低表达,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见图 1。

2.2 miR-100 mimic 转染效率

将构建好的 miR-100 mimic 分别转染入 PANC-1 和 MIA PaCa-2 细胞系中,48 h 后提取 RNA 并用 PCR 进行验证,NC 组的表达量明显低于 mimic 组,差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见图 2。

2.3 miR-100 对胰腺癌细胞侵袭能力的影响

Transwell 实验结果显示,两株细胞系中,NC 组的下室细胞数量明显要高于 mimic 组,差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见图 3。

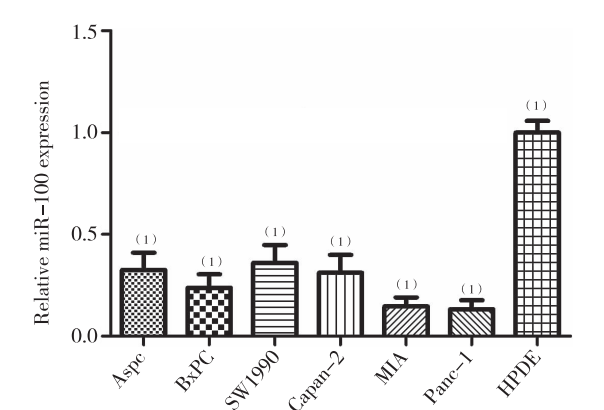
2.4 miR-100 对胰腺癌细胞迁移能力的影响

细胞划痕实验结果发现,48 h 后 NC 组的细胞迁移的距离明显比 mimic 的细胞迁移的距离要长,差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见图 4。

2.5 miR-100 对细胞骨架的影响

在 PANC-1 和 MIA PaCa-2 细胞系的 mimic 组中,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,从而迁移能力减弱。与

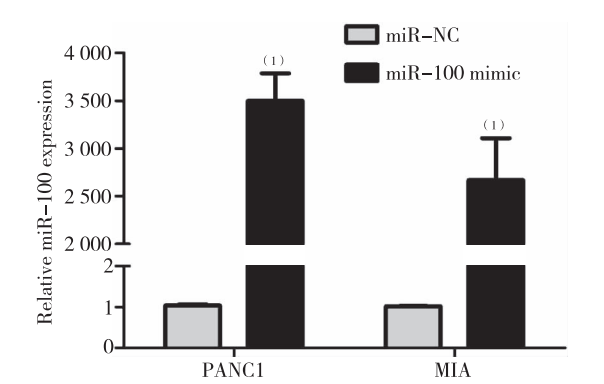
NC 组相比,mimic 组的 F-actin 明显减少,差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见图 5。



注:人胰腺癌细胞 Aspc、BxPC、SW1990、Capan-2、MIA、Panc-1,正常胰腺上皮细胞 HPDE; (1) 与 HPDE 比较,  $P < 0.05$

图 1 miR-100 在人胰腺癌细胞系和正常胰腺上皮细胞系中的表达 (PCR)

Fig. 1 Expression of miR-100 in human pancreatic cancer cell and normal pancreatic epithelial cell



(1) 与 MIR-NC 比较,  $P < 0.05$

图 2 转染 miR-100 mimic 后 miR-100 的表达

Fig. 2 Expression of miR-100 after transfected miR-100 mimic

2.6 FZD-8 的蛋白表达

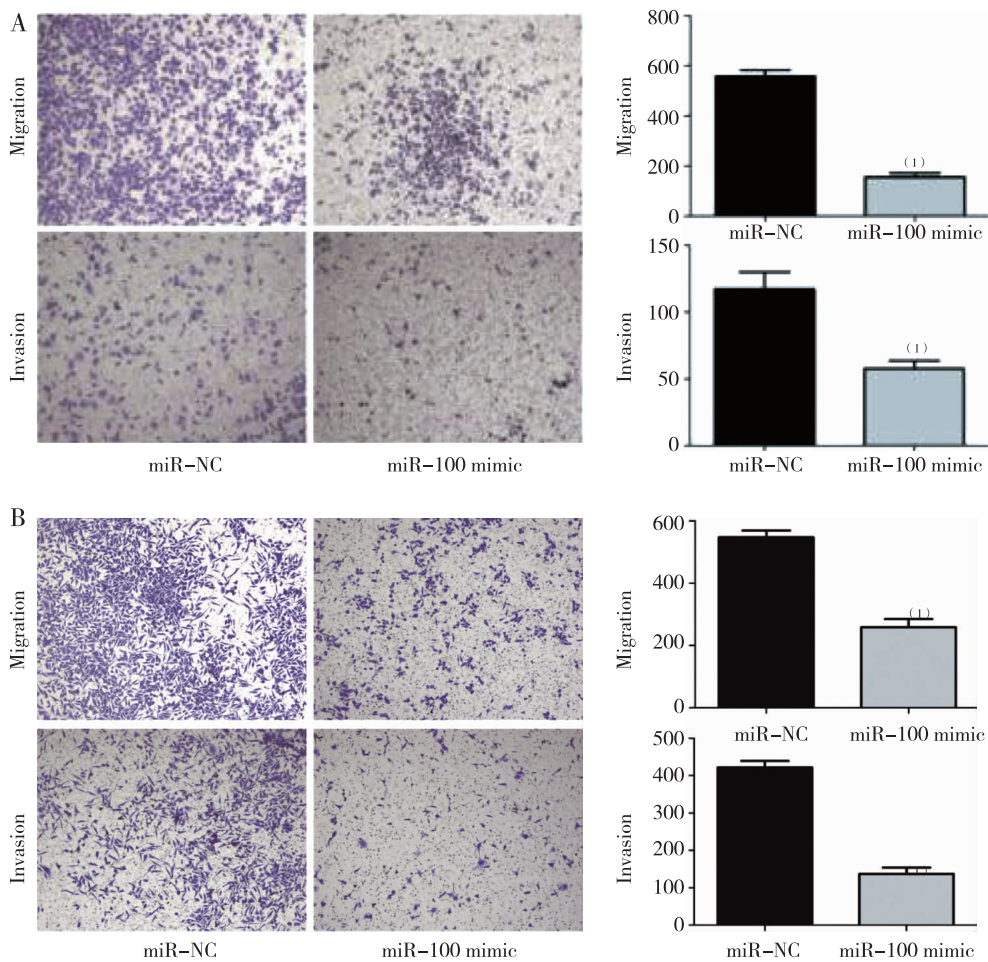
Western blot 结果显示,转染 miR-100 mimic 后,可以抑制 FZD-8 的蛋白表达。见图 6。

3 讨论

胰腺癌在早期就易发生侵袭转移是其引起高死亡率的主要原因之一,但其侵袭转移的机制目前并不完全清楚。研究认为,miRNAs 的表达失衡对胰腺癌侵袭转移具有重要影响。miR-100 定位于人类基因组中 11q24.1,大小为 22 个核苷酸,基因序列为 AACCCGUAGAU-CCGAACUUGUG。与其它

miRNA 一样,miR-100 可通过与靶基因 mRNA 的非翻译区完全或不完全的互补配对结合,降解 mRNA 或抑制 mRNA 翻译,从而在转录后水平上调节基因的表达,进而影响细胞的增殖分化,凋亡及侵袭转移等<sup>[5]</sup>。近年来的研究发现,miR-100 在一些肿瘤细胞中是低表达的,例如肺癌,结肠直肠癌,前列腺癌,和卵巢癌,在这些恶性肿瘤细胞中,上调 miR-100 的表达,可以抑制癌细胞的增殖、侵袭和转移,表明 miR-100 在肿瘤的发生和进展中起着重要的作用<sup>[6-9]</sup>。以前的研究表明,miR-100 在胰腺癌细胞系中是低表达的,可以通过靶向调控 FGFR3 来

抑制胰腺癌细胞的增殖<sup>[10]</sup>。有研究证明,在乳腺癌中 miR-100 直接靶向调控 FZD-8 并激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路,从而抑制乳腺癌细胞的侵袭转移能力<sup>[11]</sup>。本研究了解到过表达 miR-100 后,FZD-8 在蛋白水平的变化,猜想 miR-100 在胰腺癌细胞中能够通过对 FZD-8 的影响来调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路,进而影响胰腺癌细胞的侵袭转移。然而,miR-100 在调节肿瘤发生中的作用和机制任有待进一步阐明。本研究将会调查 miR-100 对胰腺癌细胞侵袭转移的影响及初步探讨其机制是什么。



注:A 为 PANC-1 细胞,B 为 MIA PaCa-2 细胞;<sup>(1)</sup>与 miR-NC 比较, $P < 0.05$

图 3 miR-100 对胰腺癌细胞侵袭转移能力的影响(transwell)

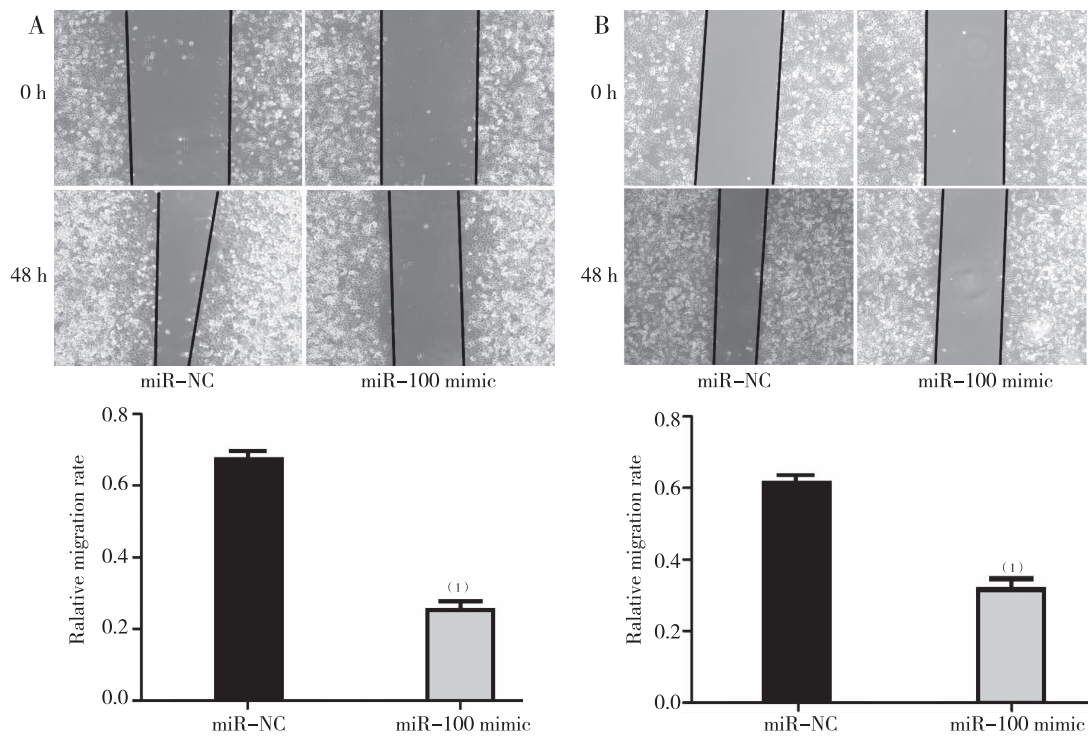
Fig. 3 Effect of miR-100 on invasion of pancreatic carcinoma cells (transwell)

本研究通过 transwell 实验,细胞划痕实验初步验证了上调 miR-100 后,能抑制胰腺癌细胞的侵袭转移能力,并通过 western blot 观察了 miR-100 对 FZD-8 的影响,即过表达 miR-100 后能抑制 FZD-8 的表达。免疫荧光实验结果显示,上调 miR-100 后,F-肌动蛋白被剪切,呈现低表达,导致其运动结

构和极性的缺失,从而迁徙能力变弱。

综上所述,miR-100 能通过影响 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路中的重要位点 FZD-8 从而抑制胰腺癌细胞的侵袭转移。本研究对胰腺癌细胞的侵袭转移提供了新的见解,然而 miR-100 对胰腺癌细胞的复杂调节网络还需进一步的探索。

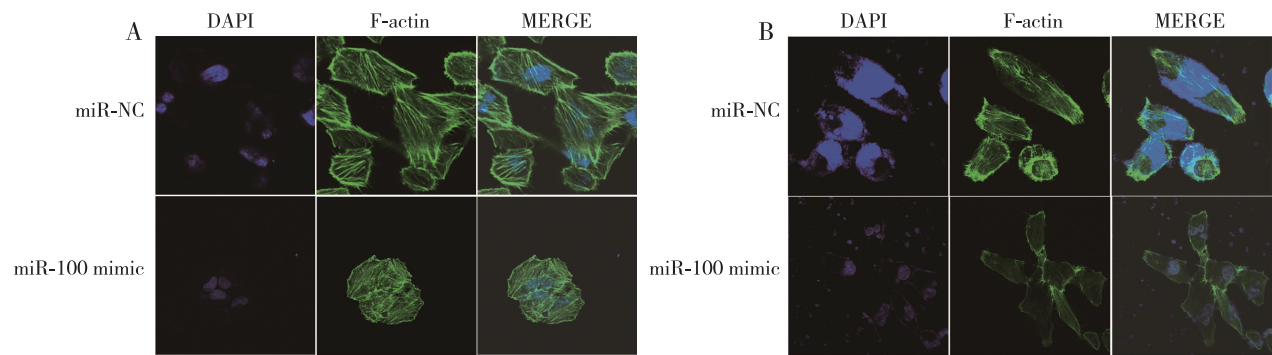




注:A 为 PANC-1 细胞,B 为 MIA PaCa-2 细胞;<sup>(1)</sup>与 miR-NC 比较, $P < 0.05$

图 4 miR-100 对胰腺癌细胞迁移能力的影响(划痕实验)

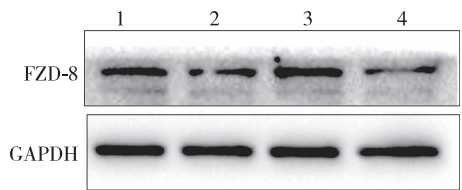
Fig. 4 Effect of miR-100 on migration of pancreatic carcinoma cells(wound assay)



注:A 为 PANC-1,B 为 MIA PaCa-2 细胞

图 5 免疫荧光检测 miR-100 对细胞骨架的影响

Fig. 5 Effect of immunofluorescence testing miR-100 on cytoskeleton



注:1、3 为 min-NC,2、4 为 miR-100;1、2 为 PANC-1 细胞,3、4 为 MIA 细胞

图 6 miR-100 对 FZD-8 的表达影响

Fig. 6 Effect of miR-100 on the expression of FZD-8

## 4 参考文献

[1] Kleeff J, Korc M, Apte M, et al. Neoptolemos, Pancreatic cancer[J]. Nat Rev Dis Primers, 2016(2):16022 – 16026.

[2] Rossi ML, Rehman AA, Gondi CS. Therapeutic options for the management of pancreatic cancer[J]. World J Gastroenterol, 2014(20):11142 – 11159.

(下转第 758 页)

- phenotype[J]. *Oncotarget*, 2015(6):2767-2778.
- [2] Jiang J, Tian S, Yu C, et al. TRIM37 promoted the growth and migration of the pancreatic cancer cells[J]. *Tumour Biol*, 2016(37):2629-2634.
- [3] Xu XD, Zhao Y, Zhang M, et al. Inhibition of autophagy by deguelin sensitizes pancreatic cancer cells to doxorubicin[J]. *Int J Mol Sci*, 2017(18):980-996.
- [4] Jiang S, Gao Y, Hou W, et al. Sinomenine inhibits A549 human lung cancer cell invasion by mediating the STAT3 signaling pathway[J]. *Oncol Lett*, 2016(12):1380-1386.
- [5] Li X, Li P, Liu C, et al. Sinomenine hydrochloride inhibits breast cancer metastasis by attenuating inflammation-related epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness[J]. *Oncotarget*, 2017(2):287-284.
- [6] Song L, Liu D, Zhao Y, et al. Sinomenine inhibits breast cancer cell invasion and migration by suppressing NF-kappaB activation mediated by IL-4/miR-324-5p/CUEDC2 axis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015(4):705-710.
- [7] Xie T, Ren HY, Lin HQ, et al. Sinomenine prevents metastasis of human osteosarcoma cells via S phase arrest and suppression of tumor-related neovascularization and osteolysis through the CXCR4-STAT3 pathway[J]. *Int J Oncol*, 2016(48):2098-2112.
- [8] Kok TW, Yue PY, Mak NK, et al. The anti-angiogenic effect of sinomenine[J]. *Angiogenesis*, 2015(1):3-12.
- [9] Yu C, Wang M, Chen M, et al. Upregulation of microRNA1385p inhibits pancreatic cancer cell migration and increases chemotherapy sensitivity[J]. *Mol Med Rep*, 2015(12):5135-5140.
- [10] Cao J, Yang JC, Ramachandran V, et al. TM4SF1 Regulates Pancreatic Cancer Migration and Invasion In Vitro and In Vivo[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016(39):740-750.
- [11] Yang J, Gong X, Ouyang L, et al. PREX2 promotes the proliferation, invasion and migration of pancreatic cancer cells by modulating the PI3K signaling pathway[J]. *Oncol Lett*, 2016(12):1139-1143.
- [12] Kim YR., Park MK, Kang GJ, et al. Leukotriene B4 induces EMT and vimentin expression in PANC-1 pancreatic cancer cells: Involvement of BLT2 via ERK2 activation[J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2016(1):67-76.
- [13] Yang Y, Bai YS, Wang Q. CDGSH iron sulfur domain 2 activates proliferation and EMT of pancreatic cancer cells via Wnt/beta-catenin pathway and has prognostic value in human pancreatic cancer[J]. *Oncol Res*, 2016(2):258-264.

(2017-04-06 收稿,2017-06-23 修回)  
中文编辑: 刘 平; 英文编辑: 苏晓庆

(上接第 753 页)

- [3] Del Chiaro M, Segersvard R, Lohr M, et al. Early detection and prevention of pancreatic cancer: is it really possible today[J]. *World J Gastroenterol*, 2014(20):12118-12131.
- [4] Xu YF, Hannafon BN, Ding WQ, microRNA regulation of human pancreatic cancer stem cells[J]. *Stem Cell Investig*, 2017(4):505-509.
- [5] Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, et al. Dreyfuss, miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs[J]. *Genes Dev*, 2002(16):720-728.
- [6] Giangreco AA, Vaishnav A, Wagner D, et al. Tumor suppressor microRNAs, miR-100 and-125b, are regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D in primary prostate cells and in patient tissue[J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2013(6):483-494.
- [7] Liu J, Lu KH, Liu ZL, et al. MicroRNA-100 is a potential molecular marker of non-small cell lung cancer and functions as a tumor suppressor by targeting polo-like kinase 1[J]. *BMC Cancer*, 2012(12):519-523.
- [8] Peng DX, Luo M, Qiu LW, et al. Prognostic implications of microRNA-100 and its functional roles in human epithelial ovarian cancer[J]. *Oncol Rep*, 2012(27):1238-1244.
- [9] Peng H, Luo J, Hao H, et al. MicroRNA-100 regulates SW620 colorectal cancer cell proliferation and invasion by targeting RAPIB[J]. *Oncol Rep*, 2014(13):2055-2062.
- [10] Li Z, Li X, Yu C, et al. MicroRNA-100 regulates pancreatic cancer cells growth and sensitivity to chemotherapy through targeting FGFR3[J]. *Tumour Biol*, 2014(35):11751-11759.
- [11] Xu L, Wen Liu TZ, et al. MicroRNA-375 suppresses human colorectal cancer metastasis by targeting Frizzled 8[J]. *Oncotarget*, 2016(7):40644-40656.

(2017-04-26 收稿,2017-06-19 修回)  
中文编辑: 刘 平; 英文编辑: 赵 毅