·基础研究·

microRNA-100 对人胰腺癌细胞增殖及皮下成瘤能力的影响*

喻 超，江建新，黎志鹏，肖 杰，潘耀振，孙诚谊**
（贵州医科大学附院 肝胆外科，贵州 贵阳 550004）

［摘 要］**目的**：研究 microRNA-100（miR-100）对人胰腺癌细胞 MIA PaCa-2 和 CFPAC-1 增殖及皮下成瘤能力的影响。**方法**：用 miR-100 慢病毒过表达载体感染 MIA PaCa-2 和 CFPAC-1 细胞，构建高表达 miR-100 细胞株；用平板克隆、CCK-8 方法检测 miR-100 对人胰腺癌细胞体外增殖能力，裸鼠皮下成瘤实验检测 miR-100 对人胰腺癌细胞成瘤能力。**结果**：慢病毒感染后，miR-100 表达在 MIA PaCa-2 细胞中提高（941 ± 171）倍，在 CFPAC-1 细胞中提高（154 ± 23）倍，差异有统计学意义（$P < 0.05$）；平板克隆形成实验提示 MIA PaCa-2 和 CFPAC-1 细胞实验组平板克隆数少于对照组病毒，差异有统计学意义（$P < 0.05$）；CCK-8 细胞增殖实验提示 MIA PaCa-2 和 CFPAC-1 细胞实验组增殖能力弱于对照组，差异有统计学意义（$P < 0.05$）；裸鼠皮下成瘤实验显示，miR-100 抑制了肿瘤裸鼠皮下成瘤。**结论**：miR-100 能从体内外抑制人胰腺癌细胞增殖及皮下成瘤能力。

［关键词］胰腺肿瘤；癌；RNA，小干扰；细胞增殖；成瘤能力
［中图分类号］R735.9 ［文献标识码］A ［文章编号］1000-2707（2015）08-0793-04

MicroRNA-100 Inhibiting Pancreatic Cancer Cell Proliferation and Tumorigenicity

YU Chao, JIANG Jianxin, LI Zhipeng, XIAO Jie, PAN Yaozhen, SUN Chengyi
(*Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China*)

［**Abstract**］**Objective**: To investigate the effects of miR-100 on proliferation and tumorigenicity of MIA PaCa-2 and CFPAC-1 cells. **Methods**: Using miR-100 lentivirus overexpression vector to infect MIA PaCa-2 and CFPAC-1 cells to establish miR-100 cell strain. Pancreatic cancer cell proliferation was analyzed using CCK-8 and colony formation assay. BALB/c Nude mice subcutaneous tumor experiment was adopted to test the effect of micorRNA-100 on HPCC. **Results**: The expression of miR-100 after infected by miR-100 lentivirus was (941 ± 171) folds in MIA PaCa-2 cells, and (154 ± 23) folds in CFPAC-1 cells, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Colony formation assay prompted the number of clones of MIA PaCa-2 and CFPAC-1 cells in experimental group were less than the control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$); CCK-8 cell proliferation experiments suggested that MIA PaCa-2 and CFPAC-1 cell proliferation in the experimental group was weaker than that of control group, difference was statistically significant ($P < 0.05$). Nude mice subcutaneous tumor experiment suggested that miR-100 inhibited tumor growth. **Conclusions**: miR-100 can inhibit human pancreatic cancer cell proliferation and tumorigenicity.

［**Key words**］pancreatic neoplasms; carcinoma; RNA, small interfering; cell proliferation; tumorigenicity

*［基金项目］国家自然科学基金（No. 81160311）；国家国际科技合作专项（No. 2014DFA31420）；贵阳市科技计划项目［筑科合同（20141001）46 号］；贵州省科学技术基金［黔科合 J 字（2015）2013 号］

**通信作者 E-mail：chengyisun@ medmail. com. cn

网络出版时间：2015 - 07 - 12 网络出版地址：http://www. cnki. net/kcms/detail/52. 5012. R. 20150712. 0957. 052. html

胰腺癌(pancreatic cancer、PC)恶性程度高,切除率低、高复发率以及多药耐药,5 年生存率不足 5%[1-2]。与正常细胞比较,肿瘤细胞的主要特点之一就是恶性增殖,因此对肿瘤细胞增殖的研究一直是肿瘤学研究的热点。在最近 20 年,愈来愈多的研究证实 MicroRNAs(miRNAs)广泛参与人类和动物胚胎的发育、器官的成熟和细胞的分化,并与肿瘤的生长、分化、侵袭转移和耐药密切相关[3-4]。miRNA 是一类长度大约为 22 个核苷酸的微小非编码单链 RNA,广泛存在动植物中,其本身不参与蛋白质编码,但可以通过靶向目的基因,与目的基因 3′非翻译区(3′UTR)的靶向序列结合,阻碍目的基因蛋白质的翻译或引起 mRNA 的降解[5]。microRNA-100(miR-100)在恶性胶质瘤、肝癌、膀胱癌中表达下调,其低表达与肿瘤的恶性相关[6-8]。然而,miR-100 在 PC 中的表达以及在 PC 发生、发展过程中作用却知之甚少。本课题的前期研究发现,PC 组织中 mircroRNA-100(miR-100)的表达较癌旁组织明显降低,并与 PC 增殖、分化密切相关[9]。本研究将以相对低表达 miR-100 的 PCCF-PAC-1 和 MIA PaCa-2 细胞为研究对象,慢病毒表达载体感染,构建高表达 miR-100 的 PC 细胞株探讨 miR-100 对人 PC 细胞增殖及皮下成瘤能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料及细胞培养

MIA PaCa-2 和 CFPAC-1 人 PC 细胞,购自美国模式培养物集存库。免疫缺陷雄性 BALB/c 裸鼠,SPF 级,日龄 35 d,体重 18 ~ 22 g,购自北京华阜康实验动物有限公司,饲养环境保持恒定的温度 22 ~ 25 ℃和恒定的湿度(40% ~ 50%)的 SPF 层流室中,交替给予 12 h 光照和 12 h 黑暗,标准颗粒饲料喂养,自由进食。miR-100 相关慢病毒表达载体及对照病毒由上海吉凯公司设计并合成,高糖 DMEM、胎牛血清、0.25% 胰蛋白酶和青 - 链霉素均购于美国 Gibco 公司; miR-100 和管家基因 U6 的逆转录引物、实时定量 PCR 引物由广州瑞博公司设计并合成,TRIzol 购于美国 BD 公司,逆转录试剂盒、SYBR Green 试剂盒购买自大连宝生物工程有限公司,CCK8 试剂盒购自东仁化学科技(上海)有限公司,MIA PaCa-2 和 CFPAC-1、细胞培养条件:高糖 DMEM,10% 胎牛血清,37 ℃,5% CO_2。

1.2 miR-100 慢病毒载体对 PC 细胞的感染

取对数生长期的 MIA PaCa-2 及 CFPAC-1 细胞,以 1×10^5 数量均匀接种于 6 孔板内,培养过夜。按照 MIA PaCa-2 MOI = 5,CFPAC-1 MOI = 10 病毒复感染指数进行细胞病毒感染,培养 12 h 后,观察细胞生长状态,进行细胞换液,更换为新鲜培养液。72 h 后,实时定量 PCR 分析感染慢病毒后 miR-100 表达变化,取细胞融合度在 80% 左右的 25 mL 规格培养瓶 1 瓶,加入 1 mL TRIzol,按照 TRIzol 提取 RNA 的标准步骤提取总 RNA。Eppendorf 分光光度仪检测 RNA 浓度与纯度,以 2 μg 总 RNA 进行逆转录后,用 Stem-Loop 方法检测各样本中 miR-100 的表达水平,U6 作为内参对照,实验结果采用 2-ΔΔCT 法分析。计算方法:待测样品相对值 = 2ΔΔCt,ΔΔCt = ΔCt 待测样品-ΔCt RNU6B,Ct = Ct 阴性对照-Ct 待测样品;目的基因的浓度除以其管家基因的浓度,即为此样品基因的校正后的相对含量。每个样品每次实验至少设置 3 个复孔,并重复 3 次实验(从 RNA 提取开始)。

1.3 细胞克隆形成实验检测细胞增殖能力

将处在对数生长期的各组 MIA PaCa-2 和 CF-PAC-1 细胞,制备成单细胞悬液。取 5.0×10^3 个各组细胞种植 6 孔板,每组设置 3 个复孔,后补充培养液至每孔 2 mL,使细胞分散均匀,培养箱中培养 1 ~ 3 周。每日定时拿出 6 孔板,显微镜下观察,当 6 孔板中出现明显的细胞集落时,实验组与对照组均终止培养。4% 多聚甲醛固定后,结晶紫染色液进行细胞染色,漂洗染色液后,室温晾干。将 6 孔板放置在倒置显微镜低倍视野下,直接计算形成的细胞克隆数量,分别计算各分组各复孔的克隆形成数量,以均数加减标准差的格式记录,实验重复 3 次。

1.4 CCK-8 检测 miR-100 慢病毒对细胞增殖的影响

将不同处理的 5.0×10^3 个/mL 各组 MIA PaCa-2 和 CFPAC-1 细胞接种于 96 孔板中,每组细胞设置 6 个复孔,每组设置 4 块 96 孔板,常规培养,分 4 个时间点检测(24、48、72 和 96 h);在每个时间点向每孔中加入 10 μL CCK-8 溶液,将培养板放回培养箱内孵育 2 h,用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度,吸光度反应出了细胞数量的多少,实验重复 3 次。

1.5 裸鼠皮下成瘤实验

收集慢病毒感染后高表达 miR-100 的 MIA PaCa-2 细胞及感染对照病毒和未处理的 MIA PaCa-2 细胞,制备单细胞悬液,将 PBS 与 Matrigel 以 1∶1体积配置成混合液,以混合液重悬细胞,细胞终

浓度稀释为 1×10^6/200 μL。取出饲养的裸鼠 15 只,随机分成空白对照组(untreated)、阴性对照组(lv-control)和 miR-100 慢病毒组(lv-miR-100),每组 5 只。乙醚麻醉后,MIA PaCa-2 细胞按 1×10^6 数量(200 μL)分别接种各组于裸鼠右后腿背部松软皮下,在相同的环境下饲养,每 4 d 观察 1 次,记录每只裸鼠肿瘤形成的时间、大小及裸鼠的体重,6 周后颈部脱臼处死裸鼠,解剖裸鼠取出肿瘤。

1.6　统计学方法

实验结果使用统计软件 SPSS 19.0 分析,肿瘤体积采用单因素方差分析(one-way ANOVA),数据记录采用均数加减标准差(mean ± SD),组间差异采用 t 检验,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2　结果

2.1　高表达 miR-100 细胞株的构建

实时定量 PCR 检测感染病毒后的 PC 细胞 miR-100 的表达,MIA PaCa-2 细胞 miR-100 慢病毒组表达为对照组病毒 900 多倍,CFPAC-1 细胞为 150 多倍,均明显高于对照组,差异性结果均有统计学意义($P<0.01$,图 1)。

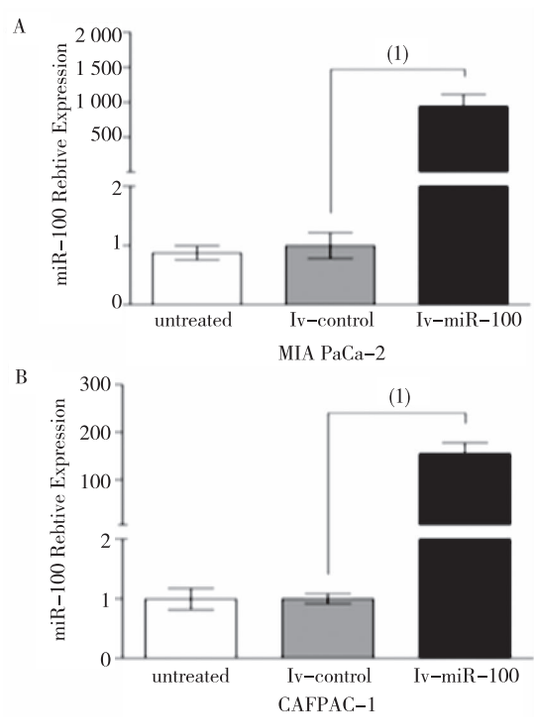
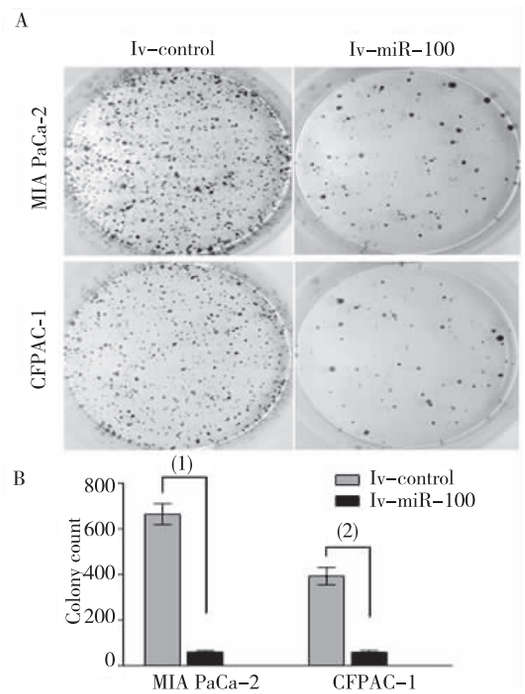


图 1　人胰腺癌细胞感染 miR-100 慢病毒后 miR-100 表达

Fig. 1　miR-100 expression in human pancreatic cancer cells infected by lv-miR-100

2.2　miR-100 抑制人 PC 细胞增殖能力

平板克隆形成实验显示,miR-100 慢病毒组细胞集落形成的数量明显少于空载体对照组,MIA PaCa-2,$P<0.05$;CFPAC-1,差异有统计学意义($P<0.001$),见图 2;CCK-8 细胞增殖检测结果显示,感染了 miR-100 慢病毒的 MIA PaCa-2 及 CFPAC-1 人 PC 细胞细胞增殖活力明显较空载体对照组减弱,见图 3。



(1)$P<0.05$,(2)$P<0.001$

图 2　miR-100 抑制 MIA PaCa-2 及 CFPAC-1 平板克隆形成

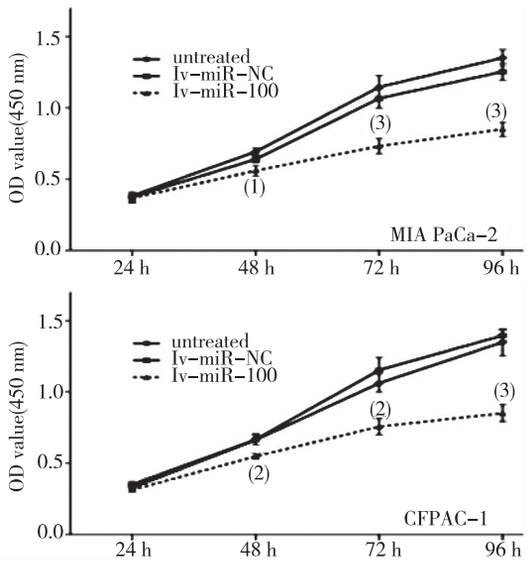
Fig. 2　miR-100 inhibition of MIA PaCa-2 and CFPAC-1 colony formation

2.3　miR-100 抑制人 PC 细胞裸鼠皮下成瘤

裸鼠皮下种植人 PC 细胞 MIA PaCa-2 后,每 4 d观察 1 次,记录肿瘤的长宽,按照体积 = 长 × 宽^2/ 2 计算肿瘤体积。第 8 天对照病毒组开始观察到皮下移植瘤,第 28 天 miR-100 慢病毒组开始观察到皮下移植瘤;第 36 天时,处死裸鼠,解剖取出肿瘤,可见 miR-100 慢病毒皮下肿瘤明显小于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 4。

2.4　裸鼠皮下肿瘤免疫组化检测常用增殖指标

在实验组 MIA PaCa-2 的裸鼠皮下移植瘤中,每组肿瘤随机收集 3 个,经过多聚甲醛固定后进行常见的增殖指标检测。结果显示,miR-100 慢病毒组 PCNA,Ki-67 的表达相比对照组均有不同程度



$^{(1)}P<0.05$, $^{(2)}P<0.01$, $^{(3)}P<0.001$

图 3　miR-100 抑制人胰腺癌细胞增殖

Fig. 3　miR-100 inhibiting proliferation of human pancreatic cancer cells

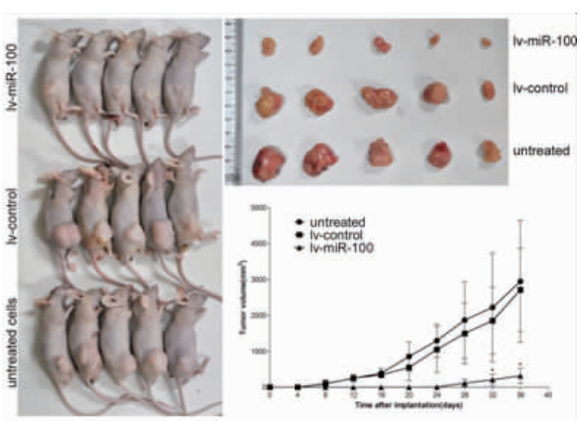


图 4　miR-100 对 MIA PaCa-2 裸鼠皮下成瘤的影响

Fig. 4　miR-100 effects on tumorigenicity in MIA PaCa-2 nude mice

的下降，见图 5。

3　讨论

PC 研究过程中有越来越多的差异性 microRNA 被发现，而不同 microRNA 在其中的表达和作用机理也不同，一些 miRNA 能促进 PC 的发生发展，而某些 miRNA 表现为抑制 PC 发展[10]，Jong-Kook Park 等[11]研究发现，miR-132 和 miR-212 在 PC 组织中表达增加，过表达的 miR-132 和 miR-212 是 PC 的促进因素；而抑制 PC 细胞 miR-132 和

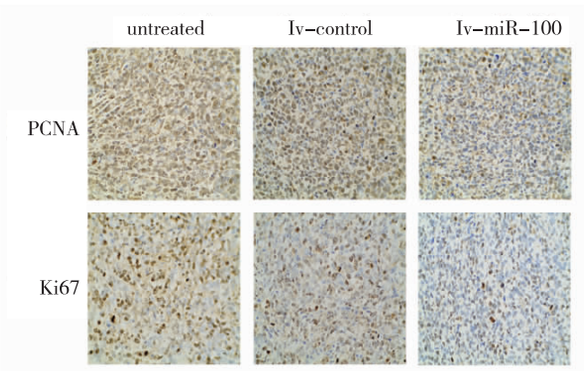


图 5　裸鼠皮下移植瘤中 PCNA 和 Ki67 表达

Fig. 5　The expression of PCNA, Ki67 in xenograft nude mice

miR-212 的表达能抑制 PC 的增殖，并且对 PC 细胞周期 G2/M 期有阻滞作用。MiR-100 在很多肿瘤中是作为抑癌基因存在的，提高其表达可抑制肿瘤细胞增殖、生长，诱导肿瘤细胞的凋亡[6-8,12]，但在 PC 中的研究较少。在前阶段的研究中，本研究验证 miR-100 在人 PC 中表达情况下同和多数其他肿瘤一样。在本实验室保存的 8 株人 PC 细胞中，MIA PaCa-2 及 CFPAC-1 细胞株 miR-100 表达相对较低，所以本研究以这两株细胞为研究对象，感染 miR-100 慢病毒过表达载体，构建高表达 miR-100 人 PC 细胞株，研究 miR-100 对人 PC 细胞各种恶性生物学效应的影响。

本研究通过平板克隆实验和 CCK-8 细胞增殖的分析，发现 miR-100 慢病毒感染人 PC 细胞 MIA PaCa-2 和 CFPAC-1 后，细胞增殖能力明显低于感染阴性对照病毒 PC 细胞，说明 miR-100 能够抑制人 PC 细胞 MIA PaCa-2 和 CFPAC-1 的体外增殖能力。通过裸鼠皮下成瘤实验，进一步说明了 miR-100 对人 PC 细胞增殖抑制在活体中的表现，裸鼠皮下移植瘤增殖指标免疫组化实验也进一步证实了 miR-100 慢病毒组肿瘤的增殖能力弱于对照组。本研究首次发现 miR-100 能抑制 PC 细胞的增殖及皮下成瘤能力，miR-100 在 PC 中的调控可能为 PC 的基因诊断和治疗提供新的思路，其具体作用机制和信号通路调控有待进一步探索。

4　参考文献

[1] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014 [J]. CA Cancer J Clin, 2014(1): 9-29.

（下转第 800 页）

转录因子 kappa B(NF-κB)的调控,而 NF-κB 在稳定心绞痛选择性和显著性的激活时,不受冠状动脉疾病的严重程度或者用药治疗方法的影响[11],因此可能导致何首乌游离蒽醌 MMPs-9 的干预效果与 HE 染色显示的 AS 斑块发展趋势不一致。总之,何首乌游离蒽醌对 MMPs-9 起到了一定的干预作用。其抗 AS 的分子机制有待进一步研究。

4 参考文献

[1] 殷亚昕,刘润梅,翟红霞,等. 不同饲料联合维生素 D3 建立大鼠动脉粥样硬化模型的比较[J]. 中国康复理论与实践, 2010(12):1134 - 1136.

[2] 王纯,梁雨露. 高血压患者颈动脉斑块和急性缺血性脑卒中的相关性[J]. 贵阳医学院学报, 2014(1):80 - 83.

[3] 何新群,岳增辉,常小荣,等. 动脉粥样硬化兔模型的建立及评价[J]. 湖南中医药大学学报, 2010(9):27 - 29.

[4] 王园园,龙民慧,周磊磊,等. 兔动脉粥样硬化动物模型的建立和评价[J]. 实验动物科学, 2008(3):18 - 21.

[5] 李琳,窦健霖,楚天舒,等. 高脂饲料喂养加静脉注射小牛血清白蛋白建立兔动脉粥样硬化模型[J]. 中国组织工程研究, 2012(20):3690 - 3693.

[6] 莫链杰,陈晨,胡希文,等. 不同免疫程序制备兔抗牛血清白蛋白抗血清的效价比较[J]. 健康研究, 2009(2):95 - 97.

[7] Knopp RH,Paramsothy P,Retzlaff BM,et al. Sex differences in lipoprotein metabolism and dietary response: basis in hormonal differences and implications for cardiovascular disease [J]. Curr Cardiol Rep, 2006(8):452 - 459.

[8] Miller AA, Drummond GR, Mast AE,et al. Effect of gender on NADPH-oxidase activity, expression, and function in the cerebral circulation: role of estroge [J]n. Stroke, 2007(38):2142 - 2149.

[9] 罗玉梅,万新红,姜德谦,等. 罗格列酮对急性冠状动脉综合征患者外周血单核细胞源性巨噬细胞表达基质金属蛋白酶 9 和组织型基质金属蛋白酶抑制剂 1 的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2009(2):132 - 161.

[10] 林梅瑟,陈碧新,赵志光,等. 姜黄素对动脉粥样硬化兔基质金属蛋白酶 9 的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007(3):189 - 192.

[11] Ritchie ME. Nuclear factor-kappaB is selectively and markedly activated in Humans with unstable angina pectoris[J]. Circulation, 1998(17):1707 - 1713.

(2015-03-07 收稿,2015-05-26 修回)
中文编辑: 刘 平; 英文编辑: 赵 毅

(上接第 796 页)

[2] Michl P, Gress TM. Current concepts and novel targets in advanced pancreatic cancer[J]. Gut, 2013(2):317 - 326.

[3] Wang Y, Kim S, Kim IM. Regulation of Metastasis by microRNAs in Ovarian Cancer[J]. Front Oncol, 2014(4):143.

[4] Blandino G, Fazi F, Donzelli S, et al. Tumor suppressor microRNAs: a novel non-coding alliance against cancer [J]. FEBS Lett, 2014(16):39 - 52.

[5] Chen K, Rajewsky N. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs[J]. Nat Rev Genet, 2007(2):93 - 103.

[6] Alrfaei BM, Vemuganti R, Kuo JS. microRNA-100 targets SMRT/NCOR2, reduces proliferation, and improves survival in glioblastoma animal models[J]. PLoS One, 2013(11):e80865.

[7] Chen P, Zhao X, Ma L. Downregulation of microRNA-100 correlates with tumor progression and poor prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. Mol Cell Biochem, 2013(1 - 2):49 - 58.

[8] Oliveira JC, Brassesco MS, Morales A G, et al. MicroRNA-100 acts as a tumor suppressor in human bladder carcinoma 5637 cells[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2011(11):3001 - 3004.

[9] 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.

[10] Rachagani S, Kumar S, Batra SK. MicroRNA in pancreatic cancer: pathological, diagnostic and therapeutic implications[J]. Cancer Lett, 2010(1):8 - 16.

[11] Park J-K, Henry JC, Jiang J, et al. miR-132 and miR-212 are increased in pancreatic cancer and target the retinoblastoma tumor suppressor[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011(4):518 - 523.

[12] Li XJ, Luo XQ, Han BW, et al. MiR-100/99a, deregulated in acute lymphoblastic leukaemia, suppress proliferation and promote apoptosis by regulating the FKBP51 and IGF1R/mTOR signalling pathways[J]. Br J Cancer, 2013(109):2189 - 2198.

(2015-04-13 收稿,2015-06-05 修回)
中文编辑: 刘 平; 英文编辑: 赵 毅