

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.03.010
文章编号: 1005-8982 (2019) 03-0052-05

MicroRNA-92a 在胰腺癌中的表达 及对肿瘤生长的影响

许勇¹, 李波¹, 林强², 钟昌桃³, 刘东², 程愿², 钟云昌²

(1. 西南医科大学附属医院 肝胆外科, 四川 泸州 646000; 2. 自贡市第三人民医院 肝胆外科, 四川 自贡 643000; 3. 自贡市第四人民医院 肝胆外科, 四川 自贡 643000)

摘要: 目的 探讨人胰腺导管腺癌 (PDAC) 中 microRNA-92a (miR-92a) 的表达及对肿瘤细胞生长的影响。**方法** 实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测 PDAC 组织中 miR-92a 的表达水平; 慢病毒转染 PANC-1 细胞构建 miR-92a 稳定敲除模型, 克隆形成与流式细胞仪检测细胞增殖凋亡; 通过裸鼠皮下种植瘤模型检测下调 miR-92a 表达对肿瘤体内生长的影响; PCR 及 Western blotting 检测 miR-92a 下游靶点 DOC-2/DAB2 结合蛋白 (DAB2IP) 在体外培养细胞中的表达水平; 免疫组织化学检测 DAB2IP 在移植瘤组织中的表达水平。**结果** miR-92a 在 PDAC 组织中表达水平高于癌旁组织 ($P < 0.05$); miR-92a 高表达的胰 PDAC 者肿瘤体积较 miR-92a 低表达者更大 ($P < 0.05$); 下调 miR-92a 的表达能够抑制胰腺癌 PANC-1 细胞体外增殖能力, 促进细胞凋亡, 并抑制 PANC-1 细胞裸鼠皮下种植瘤的生长; 下调 miR-92a 表达提高了 PANC-1 细胞内 DAB2IP 的表达水平及移植瘤组织内 DAB2IP 的表达水平 ($P < 0.05$)。 **结论** miR-92a 在胰腺癌中表达升高, 下调 miR-92a 的表达能使 DAB2IP 的表达下调而发挥抗肿瘤生长作用。

关键词: 胰腺肿瘤; microRNAs; DOC-2/DAB2 结合蛋白

中图分类号: R735.9

文献标识码: A

Effect of MicroRNA-92a on pancreatic ductal adenocarcinoma

Yong Xu¹, Bo Li¹, Qiang Lin², Chang-tao Zhong³, Dong Liu², Yuan Cheng², Yun-chang Zhong²
(1. Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, Zigong Third People's Hospital, Zigong, Sichuan 643000, China; 3. Department of Hepatobiliary Surgery, Zigong Fourth People's Hospital, Zigong, Sichuan 643000, China)

Abstract: Objective To investigate the expression and effect of MicroRNA-92a on pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). **Methods** The expression of MicroRNA-92a in PDAC was detected by qRT-PCR. MicroRNA-92a inhibitory lentivirus was utilized for establishment of MicroRNA-92a knockdown model in PANC-1 cells. Clone formation assay and flow cytometry were performed for cell proliferation and apoptosis. A subcutaneous xenotransplanted tumor model was conducted to investigate the effect of MicroRNA-92a on tumor growth *in vivo*. Expression of DAB2IP and MicroRNA-92a in mice tumor tissues were identified by Western blots or immunohistochemical (IHC). **Results** MicroRNA-92a was up-regulated in PDAC tissues ($P < 0.05$). Knockdown of MicroRNA-92a suppressed cellular proliferation ($P < 0.05$) while enhanced apoptosis rate ($t = 5.840$, $P = 0.029$) in PANC-1 cells. Down-regulation of MicroRNA-92a inhibited *in vivo* tumor growth ($P < 0.05$). Moreover, deletion of MicroRNA-92a induced increased expression of DAB2IP *in vitro* ($P < 0.05$) and *in vivo* ($P < 0.05$). **Conclusions**

收稿日期: 2018-09-27

[通信作者] 李波, E-mail: liboer2002@126.com

MicroRNA-92a facilitates PDAC tumor growth probably through activating DAB2IP.

Keywords: pancreatic tumor; MicroRNAs; DAB2IP

胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)是人类病死率最高的消化系统恶性肿瘤之一^[1]。MicroRNA 是一类长度在 25 个碱基以内的单链 RNA^[2]。microRNA-92a(miR-92a)是近年来新鉴定的出的一种 microRNA,它在胃癌^[3]、肝癌^[4]及乳腺癌^[5]中的表达水平上调并能促进肿瘤细胞生长及侵袭,提示 miR-92a 是一种潜在的促癌基因。目前,PDAC 中 miR-92a 的表达量以及与临床表现的关系尚未可知。本课题研究 PDAC 中 miR-92a 的表达情况,同时探讨高表达 miR-92a 后胰腺癌细胞增殖以及凋亡的变化。

1 资料与方法

1.1 组织标本、细胞及试剂

选取 2014 年 1 月—2016 年 1 月于西南医科大学附属医院肝胆外科收治并行手术切除的 50 例 PDAC 组织标本及对对应癌旁组织标本(距肿瘤切边缘 > 2 cm)。其中,男性 35 例,女性 15 例;年龄 40 ~ 68 岁。所有患者术前均未进行过放化疗及肿瘤辅助治疗。所有标本于离体 0.5 h 内取材,于液氮中固定保存。

胰腺癌 PANC-1 细胞购自中科院上海细胞库并由本院实验室保存,miR-92a 抑制性慢病毒颗粒(病毒载体类型:psi-LVRH1GP)购自广州复能基因公司,DMEM(11965-084)、胎牛血清(16000044)均购自美国 Gibco 公司,Annexin V 凋亡检测试剂盒(FITC/PI 双染法, E606336)购自生工生物工程(上海)股份有限公司,Trizol 试剂(15596026)、逆转录 PCR(reverse transcription PCR, RT-PCR)试剂盒(Super Script® One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase, 10928042)及实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)试剂盒(DyNAmo Flash SYBR Green qPCR Kit, F415L)均购自美国 Invitrogen 公司,兔抗人 DAB2IP 多克隆抗体(ab87811)购自美国 Abcam 公司,兔抗人 β -actin 单克隆抗体(#4970)购自美国 CST 公司,兔 SP 免疫组织化学(以下简称免疫组化)试剂盒由武汉博士德生物技术有限公司提供。

1.2 miR-92a 基因相对含量的检测

通过 Trizol 试剂提取标本及细胞 RNA,配制逆转录及 PCR 扩增体系。设置逆转录条件:50℃逆转

录 30 min,94℃变性 2 min,循环次数 1 次;94℃变性 15 s,60℃退火 30 s,68℃延伸 3 min,循环次数 40 次;72℃最终延伸 10 min。通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法检测 miR-92a 基因的相对含量。

1.3 细胞培养及慢病毒感染

PANC-1 于适宜环境中培养,稳定传代 2 ~ 3 代后进行实验。将 PANC-1 细胞过夜增殖至融合度达 70%,接种 6 孔细胞培养板。达到预定培养密度后移除培养基,1 × PBS 溶液充分洗涤细胞。慢病毒感染分组:miR-92a 抑制性慢病毒(anti-miR-92a)组每孔加入 1 ml 的 miR-92a 抑制性慢病毒上清液、2 ml 完全培养基及 15 μ g 聚凝胺(ploybrene);对照组(anti-miR-con)每孔加入 1 ml 的阴性对照慢病毒上清液、2 ml 完全培养基及 15 μ g ploybrene。转染 48 h 后,使用含 2 μ g/ml 嘌呤霉素(puromycin)的完全培养液筛选稳定转染细胞株。

1.4 平板克隆形成实验检测细胞增殖

PANC-1 细胞按 500 个每孔均匀接种于 6 孔板中,每周更换完全培养基 2 次。培养 2 周后,使用 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min,1% 结晶紫染色 15 min,置于蒸馏水中洗去多余染液。风干后将 6 孔板置于网格纸上计数每孔克隆形成数量,计算克隆形成率。每个样本独立重复实验 3 次。

1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡

PANC-1 细胞用预冷 PBS 工作液冲洗 2 次,胰酶消化细胞后 1 500 r/min 离心 5 min 沉淀细胞,预制缓冲液调整细胞数为 1×10^6 个/ml,将 500 μ l 细胞悬液与 5 μ l Annexin V-FITC 及 10 μ l PI 混合,室温避光反应 10 min 后上机测试。

1.6 裸鼠皮下移植瘤模型复制

10 只 5 周龄 BLAB/c 裸鼠,随机分为 anti-miR-92a 组和 anti-miR-con 组,每组 5 只,分组后适应性饲养 1 周。分别取对数生长期的 miR-92a 敲除细胞及阴性对照细胞,以冷 PBS 溶液制成细胞悬液,调整终浓度为 2.0×10^7 个/ml。使用 1 ml 注射器,将 0.2 ml 细胞悬液(约含 4.0×10^6 个细胞)接种于裸鼠背部近右下肢处皮下组织内,复制裸鼠皮下成瘤模型。裸鼠饲养 4 周,每周测量肿瘤长度及宽度,按公式 $1/2$ (长轴 × 短轴²)来计算肿瘤体积,绘制肿瘤生长曲线。

1.7 Western blotting 检测 DAB2IP 蛋白表达

通过 RIPA 试剂提取细胞总蛋白,凝胶垂直电泳分离蛋白,70 V 恒压转膜 150 min,5% 牛血清白蛋白封闭 1 h 后将条带孵育于 1 : 1 000 比例稀释的 DAB2IP 和 β -actin 一抗中。4℃ 过夜后,使用 1 : 5 000 稀释的辣根过氧化物酶标记二抗孵育条带 1 h。ECL 法曝光条带。

1.8 免疫组化染色检测 DAB2IP 蛋白表达

组织切片常规预处理后滴加 1 : 100 稀释的 DAB2IP 抗体,4℃ 孵育过夜。清洗残余一抗后,使用 HRP 标记的二抗结合对应的一抗,DAB 法显色。按文献 [6] 所述方法,计算每张切片的免疫组化得分。

1.9 统计学方法

数据分析采用 SPSS 13.0 统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用 t 检验或重复测量设计的方差分析,计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-92a 在 PDAC 组织中的表达情况

miR-92a 在 PDAC 组织中的表达水平 (1.458 ± 0.023) 与癌旁组织中的表达水平 (0.418 ± 0.037) 比较,差异有统计学意义 ($t = 4.832, P = 0.000$),PDAC 组织高于对应癌旁组织。

2.2 miR-92a 的表达与临床病理特征的关系

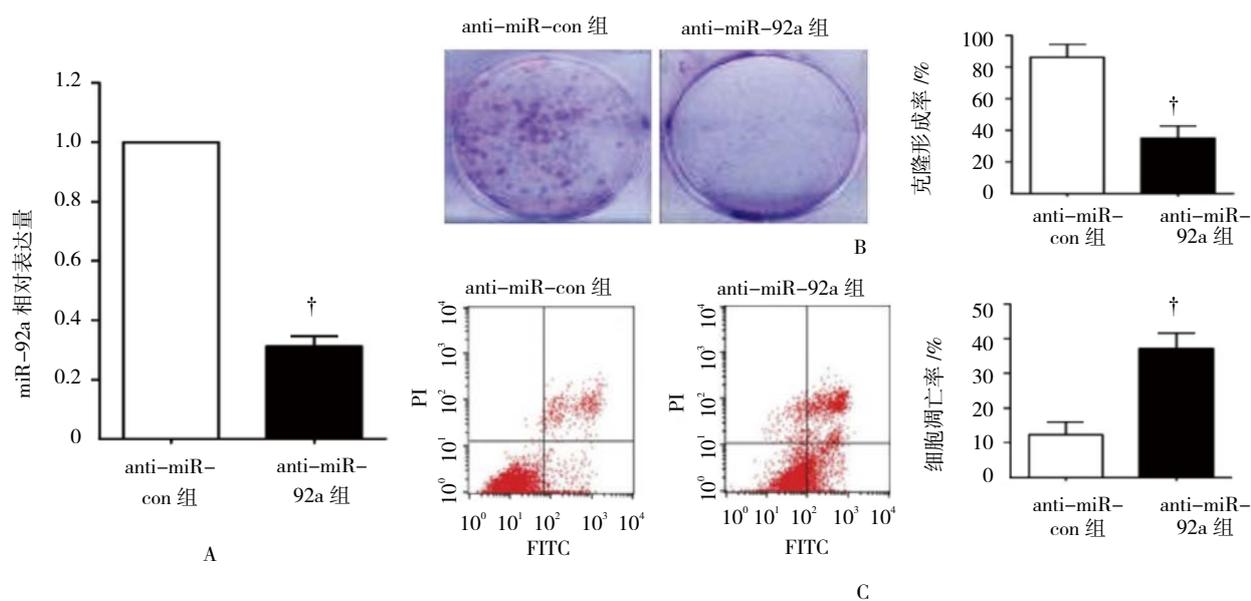
PDAC 组织中 miR-92a 高表达患者的肿瘤直径较 miR-92a 低表达者更大 ($\chi^2 = 6.256, P = 0.012$)。

2.3 在体外下调 miR-92a 表达对 PANC-1 细胞增殖凋亡的影响

感染 anti-miR-92a 慢病毒的细胞内 miR-92a 的表达水平较 anti-miR-con 组降低,差异有统计学意义 ($t = 4.439, P = 0.041$) (见图 1A)。平板克隆实验结果显示,anti-miR-92a 组克隆形成率为 (35.13 ± 7.81)%,低于 anti-miR-con 组的克隆形成率 (86.25 ± 8.19)%,差异有统计学意义 ($t = 5.452, P = 0.033$) (见图 1B)。同时下调 miR-92a 表达后,PANC-1 细胞凋亡 (37.14 ± 4.51) 较 anti-miR-con 组 (12.35 ± 3.64) 升高 ($t = 5.840, P = 0.029$) (见图 1C)。

2.4 下调 miR-92a 表达后对裸鼠皮下移植瘤生长的影响

两组皮下注射肿瘤细胞后不同时间点的肿瘤体积比较,采用重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点的肿瘤体积有差异 ($F = 8.108, P = 0.013$)。②两组肿瘤肿瘤体积有差异 ($F = 10.034, P = 0.009$),anti-miR-92a 组肿瘤肿瘤体积较 anti-miR-con 组小,miR-92a 有抑制肿瘤生长作用。③两组的肿瘤体积变化趋势有差异 ($F = 7.056, P = 0.022$) (见图 2A)。在饲养 4 周后 anti-miR-92a 组的最终肿瘤体积较 anti-



A: 两组 PANC-1 细胞内 miR-92a 表达水平; B: 下调 miR-92a 表达后, 两组 PANC-1 细胞克隆形成率; C: 下调 miR-92a 表达后两组 PANC-1 细胞凋亡情况。† 与 anti-miR-con 组比较, $P < 0.05$

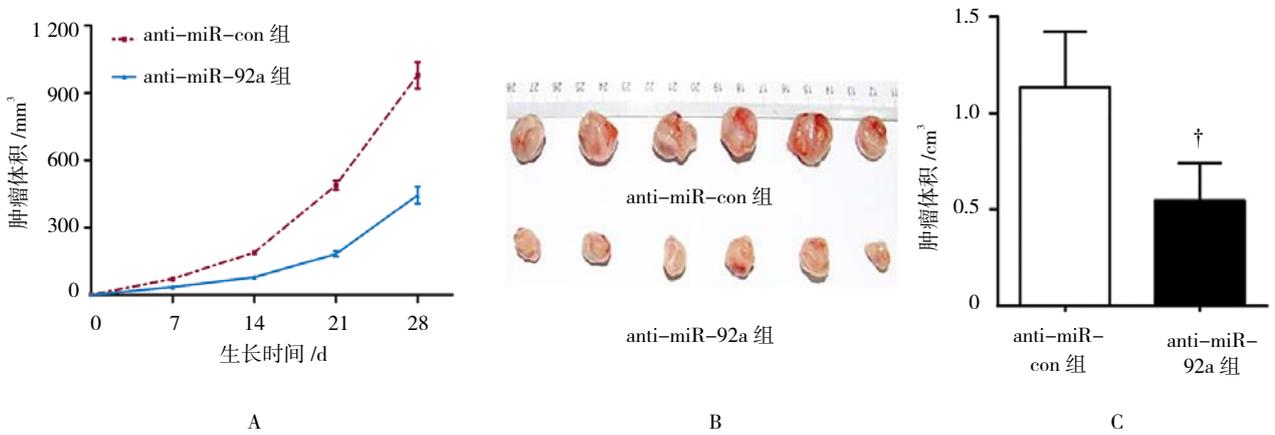
图 1 下调 miR-92a 表达对 PANC-1 细胞增殖、凋亡的影响

miR-con 组下降 ($t=3.081, P=0.014$) (见图 2B、C)。

($t=4.427, P=0.040$) 及蛋白的表达水平 ($t=5.002, P=0.036$); 同时下调 miR-92a 表达的移植瘤组织内 DAB2IP 蛋白的表达水平也降低 ($t=3.161, P=0.013$)。见图 3。

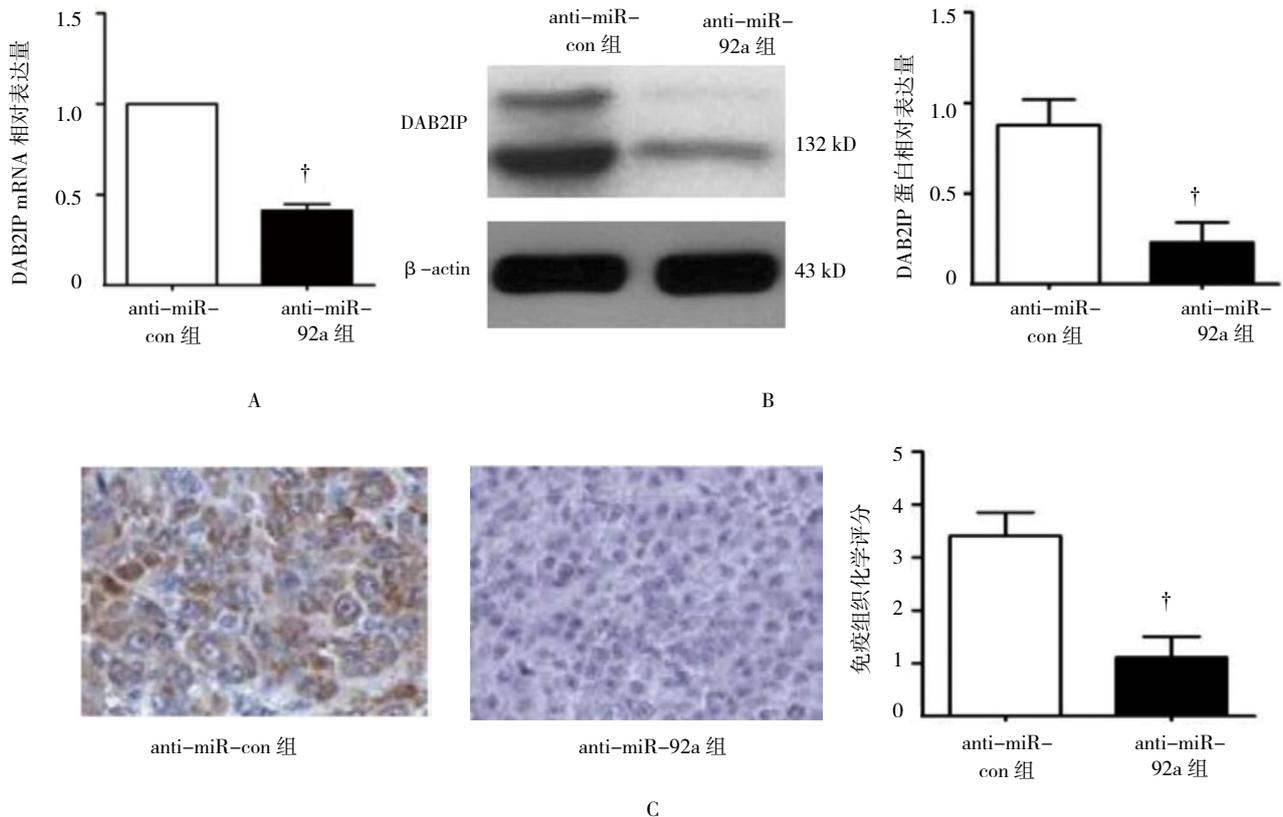
2.5 下调 miR-92a 表达对 DAB2IP 表达的影响

沉默 miR-92a 抑制 PANC-1 细胞内 DAB2IP mRNA



A: 两组肿瘤细胞在裸鼠体内的肿瘤体积; B、C: 两组裸鼠皮下移植瘤的体积。† 与 anti-miR-con 组比较, $P < 0.05$

图 2 下调 miR-92a 表达对 PANC-1 细胞移植瘤生长的影响



A: DAB2IP mRNA 的相对表达量; B: DAB2IP 蛋白的相对表达量; C: 两组移植瘤组织内 DAB2IP 蛋白的表达水平。† 与 anti-miRNA-con 组比较, $P < 0.05$

图 3 下调 miR-92a 表达对 DAB2IP 表达的影响

3 讨论

本研究结果显示, PDAC 组织中 miR-92a 的表达水平高于癌旁组织。提示 miR-92a 在胰腺癌中可能是一种被上调的促癌因子。不同的体外及体内研究表明, 抑制 miR-92a 的表达能够削弱细胞增殖并促进细胞凋亡。在动物实验中, 也发现抑制 miR-92a 表达的 PANC-1 细胞在体内抑制肿瘤细胞的生长。miR-92a 可能是一种具有多项促癌功能的 microRNA, 最新文献也指出, miR-92a 也具有促进肿瘤转移^[7]及增强化疗抵抗^[8]的作用。类似报道的结果值得大家在今后的工作中进一步深入研究 miR-92a 的生物学功能。

MicroRNA 能够通过结合靶基因 3'-UTR 区而发挥负向调控作用。笔者通过生物信息学检索分析发现, 凋亡诱导因子 DAB2IP mRNA 的 3'-UTR 区存在 miR-92a 的结合位点。既往研究^[9]也表明, DAB2IP 在胰腺癌细胞内表达降低且具有抑癌作用, 其可能是 miR-92a 的潜在靶点之一。通过 PCR 及 Western blotting 发现, 下调 miR-92a 在体外能促进 DAB2IP 的表达, 进一步通过免疫组化发现沉默 miR-92a 表达的移植瘤组织中 DAB2IP 的表达也出现恢复性升高。研究指出, DAB2IP 能够下调包括 Ras-Raf-ERK^[10]和 PI3K-Akt^[11]在内的许多促进肿瘤细胞生长的信号通路的活性。提示 miR-92a 的促进肿瘤生长作用可能是与解除 DAB2IP 对多条激酶信号通路的抑制有关。

综上所述, miR-92a 在胰腺癌中高表达, 沉默 miR-92a 可能通过恢复 DAB2IP 的表达而抑制胰腺癌细胞生长。

参 考 文 献:

[1] WANG X, REN H, ZHAO T, et al. Single nucleotide polymorphism in the microRNA-199a binding site of HIF1A gene is associated

with pancreatic ductal adenocarcinoma risk and worse clinical outcomes[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(12): 13717.

- [2] RUDONG L I, QIAN WANG, BINCHENG Y E. Enzyme-free detection of sequence-specific microRNAs based on nanoparticle-assisted signal amplification strategy[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2016, 77(77): 995-1000.
- [3] REN C, WANG W, HAN C, et al. Expression and prognostic value of miR-92a in patients with gastric cancer[J]. *Tumor Biology*, 2016, 37(7): 9483-9491.
- [4] WANG L, WU J, XIE C. miR-92a promotes hepatocellular carcinoma cells proliferation and invasion by FOXA2 targeting[J]. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 2017, 20(7): 783.
- [5] SI H, SUN X, CHEN Y, et al. Circulating microRNA-92a and microRNA-21 as novel minimally invasive biomarkers for primary breast cancer[J]. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2013, 139(2): 223-229.
- [6] LI C, MIAO R, LIU S, et al. Down-regulation of miR-146b-5p by long noncoding RNA MALAT1 in hepatocellular carcinoma promotes cancer growth and metastasis[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(17): 28683.
- [7] REN P, GONG F, ZHANG Y, et al. MicroRNA-92a promotes growth, metastasis, and chemoresistance in non-small cell lung cancer cells by targeting PTEN[J]. *Tumor Biology*, 2016, 37(3): 3215-3225.
- [8] GONG J, HE L, MA J, et al. The relationship between miR-17-5p, miR-92a, and let-7b expression with non-small cell lung cancer targeted drug resistance[J]. *Journal of Buon*, 2017, 22(2): 454.
- [9] DONG D, JIANG W, LEI J, et al. Ubiquitin-like protein FAT10 promotes bladder cancer progression by stabilizing survivin[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(49): 81463.
- [10] LI X, DAI X, WAN L, et al. Smurf1 regulation of DAB2IP controls cell proliferation and migration[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(18): 26057.
- [11] WANG B, GU Q, LI J. DOC-2/DAB2 interactive protein regulates proliferation and mobility of nasopharyngeal carcinoma cells by targeting PI3K/Akt pathway[J]. *Oncology Reports*, 2017, 38(1): 317-324.

(王荣兵 编辑)