

microRNA-372 靶向 SDC1 抑制人胰腺癌上皮间质转化及侵袭

马 瑾 王建承

摘 要 **目的** 探讨 microRNA-372 (miR-372) 靶向调控 SDC1 基因表达抑制人胰腺癌上皮间质转化及侵袭的机制研究。**方法** 收集人胰腺癌及癌旁组织手术标本;qRT-PCR 和免疫组化法检测组织中 miR-372 和 SDC1 表达;筛选 miR-372 表达水平最高的人胰腺癌细胞系进行分组和转染,实验分成 6 组,即空白对照组、阴性对照组、miR-372 mimic 组、miR-372 inhibitor 组、siRNA-SDC1 组和 miR-372 inhibitor + siRNA-SDC1 组;双荧光素酶报告基因试验验证 miR-372 和 SDC1 基因的靶向关系;CCK8 法、流式细胞术、划痕试验及 Transwell 试验分别检测各组细胞转染后增殖能力、凋亡情况、迁移及侵袭能力;qRT-PCR 和 Western blot 法检测各组细胞转染后 SDC1 和上皮细胞标志物 E-cadherin 及间质表型细胞标志物 Vimentin 的表达水平。**结果** SDC1 蛋白在胰腺癌组织中的阳性表达率明显高于癌旁正常组织 ($P < 0.05$)。胰腺癌中 miR-372、SDC1 表达与肿瘤分化程度、转移和 TNM 分期显著相关 ($P < 0.05$)。双荧光素酶报告基因试验结果显示 SDC1 是 miR-372 的靶基因。与空白对照组和阴性对照组比较,miR-372 mimic 组和 siRNA-SDC1 组细胞的生长、迁移和侵袭受到抑制,凋亡率增加,SDC1 和 Vimentin 的表达水平明显降低,E-cadherin 的表达水平明显升高 (P 均 < 0.05);而 miR-372 inhibitor 组的趋势与 miR-372 mimic 组和 siRNA-SDC1 相反 (P 均 < 0.05);然而,miR-372 inhibitor + siRNA-SDC1 组与空白对照组和阴性对照组比较,各项指标差异均无统计学意义。**结论** miR-372 可能通过靶向抑制 SDC1 基因表达,抑制人胰腺癌细胞的迁移、侵袭和上皮间质转化。

关键词 miR-372 SDC1 人胰腺癌 上皮间质转化 侵袭

中图分类号 R73 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.10.032

Effects of MicroRNA-372 and Its Target Gene SDC1 on Epithelial Mesenchymal Transition, Migration and Invasion in Human Pancreatic Cancer Cells. Ma Jin, Wang Jiancheng. Department of Gastroenterology, Luwan Branch of Ruijin Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200020, China

Abstract Objective To explore the effects of microRNA-372 (miR-372) and its target gene SDC1 on epithelial mesenchymal transition (EMT), migration and invasion in human pancreatic cancer (PC) cells. **Methods** Human PC tissues and their paracancerous tissues were collected from PC patients. SDC1 expression in tissues was detected by qRT-PCR and immunohistochemistry. Human PC cell line with the highest expressions of miR-372 expression were selected, and then assigned into the blank, negative control (NC), miR-372 mimic, miR-372 inhibitor, siRNA-SDC1 and miR-372 inhibitor + siRNA-SDC1 groups. Double luciferase reporter gene assay was used to verify the targeting relationship between miR-372 and SDC1. The abilities of cell proliferation, apoptosis, migration and invasion were detected by CCK-8 assay, flow cytometry, scratch test and Transwell assay, respectively. Expression levels of SDC1 and EMT-related genes (E-cadherin and vimentin) after transfection were detected by qRT-PCR and Western blot. **Results** The positive expression rate of SDC1 protein in PC tissue was significantly higher than that in paracancerous tissues ($P < 0.05$). The expressions of miR-372 and SDC1 in PC tissues were significantly related to tumor differentiation, metastasis and TNM staging (P all < 0.05). Double luciferase reporter gene assay confirmed that SDC1 was the target gene of miR-372. Compared with the blank group and the NC group, the miR-372 mimic group and the siRNA-SDC1 group showed inhibited cell growth, migration and invasion, increased cell apoptosis, decreased expressions of SDC1 and vimentin, and increased expression of E-cadherin (P all < 0.05). The miR-372 inhibitor group presented the opposite tendencies. However, there were no significant differences between the miR-372 inhibitor + siRNA-SDC1 group in comparison to the blank group and the NC group (P all > 0.05). **Conclusion** Our study suggests that miR-372 could inhibit EMT, migration and invasion in human PC cells by inhibiting the expression of SDC1.

Key words microRNA-372; SDC1; Pancreatic cancer; Epithelial mesenchymal transition; Invasion

作者单位:200020 上海交通大学医学院附属瑞金医院卢湾分院消化科(马瑾);200025 上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科(王建承)

通讯作者:王建承,电子邮箱:mrmajiancheng@126.com

胰腺癌是恶性程度最高的消化道恶性肿瘤之一,该疾病的预后极差,因为患者的早期诊断困难、手术切除率低、高转移率以及对放化疗有抵抗性^[1]。胰腺癌患者的 5 年生存率常年处在 4%~5% 左右,并且由于这种疾病的特殊侵袭性生物学行为,诊断为胰腺癌的所有患者中只有 20% 能够进行外科手术^[2,3]。因此,深入研究胰腺癌分子机制可能为改善胰腺癌患者的治疗效果以及预后提供新的理论和策略。越来越多研究表明,microRNAs 调控细胞迁移和增殖等多种细胞活动,它的失调会引起多种恶性肿瘤的发生,如胃癌和乳腺癌等^[4-6]。上皮间质转化(EMT)是指在一些特殊的生理和病理情况下,上皮细胞向间质细胞转化的一种现象,并且肿瘤细胞的生长及转移与上皮间质转化过程息息相关^[7]。

Syndecan-1 (SDC1 基因)是跨膜乙酰肝素蛋白聚糖的成员之一,主要在上皮细胞中表达,通过控制细胞增殖、分化、黏附等在肿瘤中发挥作用,在炎症和伤口愈合中起重要作用,并且有研究表明 SDC1 基因被 microRNAs 调控在病症中起作用^[8-10]。然而,miR-372 靶定调控 SDC1 基因表达,通过抑制上皮-间质转化对胰腺癌侵袭的影响尚未发现有相关报道。因此,本研究旨在观察 miR-372 在胰腺癌中的表达水平,通过靶基因验证,阐述 miR-372 影响胰腺癌特殊生物特性的具体分子机制,并深入研究其对胰腺癌侵袭转移的影响,将为临床治疗胰腺癌提供一个新靶点。

对象与方法

1. 研究对象:选取 2013 年 11 月~2016 年 11 月在笔者医院行手术切除并经病理证实的胰腺癌患者 124 例,其中男性 77 例,女性 47 例,患者年龄 28~80 岁。纳入标准:①均为笔者医院手术病理证实的胰腺癌,临床资料完整;②术前没有胰腺炎病史、放化疗史及胰腺相关手术史;③手术顺利,术后无不良并发症。排除标准:①无病理证实的病例;②有胰腺相关病史;③不符合手术适应证。按所选取胰腺组织分化程度分为高分化组 37 例,低中分化组 87 例^[11]。淋巴结转移组 79 例,无转移组 45 例。按 2007 年 UICC 标准 TNM 临床分期:I~II 期 52 例,III~IV 期 72 例。所有患者术前均未接受放化疗治疗,临床资料完整。所有样本保留胰腺癌组织及癌旁组织。组织标本在术中切除后马上分装到 EP 冻存管并保存于冰箱(-80℃)。本研究经过笔者医院学术伦理委员会批准,所有入选样本都经患者同意并签署知情同意书。

2. 细胞培养与细胞筛选:选用人胰腺非肿瘤细胞系 HPDE6c7 和人 PDAC(胰腺导管腺癌)细胞系 ASPC-1、SW1990、BXPc-3、CFPAC-1 和 PANC-1(购自中国科学院上海细胞库)。于 10% 胎牛血清(美国 Sigma 公司)的完全培养液 DMEM(美国 Gibco 公司)(含 100U/ml 青霉素和 100μg/ml 链霉素)中,37℃、体积分数 5% 的 CO₂、饱和湿度条件下培养。筛选 SDC1 表达水平最高的细胞系用于后续实验。

3. qRT-PCR 检测 miR-372 表达及 SDC1、E-cadherin 和 Vimentin 的 mRNA 表达水平:采用 Trizol 试剂盒提取总 RNA(美国 Invitrogen 公司)提取组织及细胞总 RNA,分别测定 RNA 浓度,取 1μg 总 RNA 进行反转录。反转录采用 PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real-Time) 试剂盒(RR047A,日本 TaKaRa 公司),反转录合成 cDNA 后以其为模板,利用 Primer Premier 5.0 软件进行引物设计,委托 Invitrogen 公司进行引物合成。定量 PCR 采用酶标仪测定样本 RNA 的纯度和浓度,以 U6 为 miR-372 内参,β-actin 为 SDC1、E-cadherin 和 Vimentin 基因内参检测其 mRNA 表达水平。反转录条件:37℃ 60min,85℃ 5min。RT-PCR 在 Bio-Rad 仪器(10021337,美国 Bio-Rad 公司)上进行,qRT-PCR 反应条件:95℃ 预变性 3min、95℃ 变性 10s、60℃ 退火 20s、72℃ 延伸 30s,共 40 个循环,采用 2^{-ΔCt}法计算各组细胞 SDC1、E-cadherin 和 Vimentin 基因的 mRNA 表达水平。引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

名称	序列(5'→3')
miR-372	上游:GCCCGCAAAGTGCTGCGACAT
	下游:CCAGTGCAGGCTCCGAGGT
U6	上游:CGCTTCGGCAGCACATATACTA
	下游:CGCTTCACGAATTTGCGGTGTCA
SDC1	上游:GAGAGGAATCCGGCAGTAGA
	下游:GAGCCATCTTGATCTTCAGG
E-cadherin	上游:TCCATTCTT
	下游:CACCTTCAGCCAACCTGTTT
Vimentin	上游:TGGCAGCTCTTGACCTTGAA
	下游:GGTCATCGTGATGCTGAGAA
β-actin	上游:GCACCACACCTTCTACAATGAGC
	下游:GGATAGCACAGCCTGGATAGCAAC

SDC1(Syndecan 1).多配体蛋白聚糖-1;E-cadherin.上皮细胞钙黏蛋白;Vimentin.波形蛋白

4. 免疫组化法检测 SDC1 阳性表达率:肿瘤组织经甲醛固定、脱水、石蜡包埋、4μm 厚连续切片。标

本常规脱蜡至水,经高压抗原修复 2min 处理。抗原修复液为枸橼酸盐缓冲液,3% H_2O_2 置室温 10 min 以阻断内源性过氧化物酶活性。鼠抗人 SDC1 单克隆抗体 (ab128936,美国 Abcam 公司)按稀释 1:8000 后 4℃ 孵育过夜,恢复至室温后清洗 3 次。然后滴加山羊抗鼠 FITC 二抗 (美国 Jackson 公司),37℃ 处理 30min。接着用 PBS (上海试剂一厂)清洗后,DAB (上海试剂一厂)染色,复染后封片。用已知的阳性切片做阳性对照,以 PBS 代替一抗做阴性对照。免疫组织化学阳性判定标准:以胞核或胞质呈现棕黄色颗粒视为 SDC1 蛋白阳性表达。双盲法对结果进行评判,并根据染色细胞百分率和染色强度综合计分对结果进行判定。0 分:无阳性细胞,1 分:阳性细胞比例 <10%,2 分:10% ~ 50%,3 分:51% ~ 80%,4 分:>80%;0 分:无染色,1 分:弱染色,2 分:中等染色,3 分:强染色计。结合两项结果的乘积将 SDC1 蛋白表达分两等级:≤4 分为阴性,>4 分为阳性。

5. 双荧光素酶报告基因试验:按照 TIANGEN 生物 TIAN amp Genomic DNA Kit 操作说明进行 DNA 提取,通过 microRNA 靶基因预测软件 microrna.org 获取 miR-372 与 SDC1 基因 3'UTR 潜在的补结合位点,设计成对 PCR 扩增引物,构建含有 miR-372 应答序列的 SDC1 3'UTR 片段。用 Dual-Luciferase Reporter Assay System (E1910,美国 Promega 公司)进行样品 Luciferase 活性检测。转染 48h 后,吸去旧的培养基,用 PBS 清洗两次,每孔细胞加入 100 μ l 的 PLB (Passive Lysis Buffer),室温轻微振摇 15min,收集细胞裂解液。设置程序预读 2s,读值 10s,LAR II Stop & Glo[®] Reagent 每次进样量 100 μ l。将配制好的 LAR II Stop & Glo[®] Reagent 和加入细胞裂解液的发光管或板 (每样品取 20 μ l) 放入生物发光检测仪。运行程序,荧光读值结束后,保存数据,重复 3 次实验,每次 3 个重复。

6. 细胞分组与转染:选择 SDC1 表达水平最高的 PDAC 细胞系进行培养,将对数生长期的胰腺癌细胞,接种于 6 孔板,每孔约 1×10^5 个细胞,待细胞汇合度达 70% 时将培养液倒掉,用无血清、无抗生素的培养液洗涤细胞 3 次后继续培养,在待转染的培养板中加入质粒-脂质体混合物 (美国 Invitrogen 公司),轻晃 30s,5% CO_2 、37℃ 培养 5h 后,弃去旧培养液加入新鲜含血清的培养液,继续培养细胞 48h。参照 Lipofectamine2000 转染试剂 (美国 Invitrogen 公司)说明书,实验分为 6 组:将 miR-372 类似物转染

miR-372 mimic 组、抑制物转染 miR-372 inhibitor 组、miR-372 阴性对照序列转染阴性对照组、siRNA-SDC1 转染 siRNA-SDC1 组和 miR-372 inhibitor + siRNA-SDC1 转染 miR-372 inhibitor + siRNA-SDC1 组。空白对照组不转染任何序列。miR-372 (mimic、inhibitor、阴性对照)和 siRNA-SDC1 购自上海吉玛生物科技公司。

7. Western blot 法检测各组细胞的蛋白表达水平:转染 48h 收集各组细胞,加入 RIPA 细胞裂解液 (上海碧云天公司)提取细胞总蛋白。采用 BCA 法测蛋白浓度 (Keygen 公司),并用 5 $\times$ 上样缓冲液混合蛋白后沸水浴中煮 10min,加热变性后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。半干电转至 PVDF 膜 (美国 Millipore 公司),采用 5% 脱脂牛奶进行封闭 1h。随后,加入 1:8000 倍稀释的鼠抗人 SDC1 抗体 (美国 Abcam 公司)、E-cadherin 抗体、N-cadherin 抗体、Vimentin 抗体 (北京中杉金桥生物技术公司),4℃ 孵育过夜。洗膜后再加入 1:5000 倍稀释的辣根过氧化物酶山羊抗小鼠标记二抗 (美国 Abcam 公司),37℃ 孵育 1h。最后,加入 ECL 化学发光底物曝光显色,扫描胶片。凝胶图像处理系统 (美国 UVP 公司)分析目的条带的光密度值,以 β -actin 为内参进行标准化处理。

8. CCK-8 法检测各组细胞生长:当各组细胞生长密度达到 80% 左右时,PBS 液洗 2 遍,0.25% 胰酶消化细胞,制成单细胞悬液。计数后,以每孔 5×10^3 个细胞接种于 96 孔板中,每孔体积 100 μ l,重复 6 孔,放入细胞培养箱 (美国 Thermol Formal 公司)孵育,分别于培养 24、48、72h 时取出培养板,每孔加入 10 μ l CCK8 (VP757,日本同仁公司)继续培养 2 h,在酶联免疫检测仪 (意大利 Dasit 公司) 450nm 处读取各孔吸光度 (A) 值。每次实验重复 3 次,以时间点为横坐标,A 值为纵坐标绘制细胞活力曲线图。

9. 流式细胞术检测各组细胞周期和凋亡:细胞转染 48h 后,以不含 EDTA 的胰酶消化并收集细胞于离心管离心,弃上清。冷 PBS 洗涤细胞 3 次,离心弃上清。加入 1mg/ml RNase A 和 50 μ g/ml PI (美国 Invitrogen 公司),反应并染色 30min,然后上流式细胞仪 (美国 BD 公司)收集细胞,并用 Modfit 软件 (美国 Bio-Rad 公司)分析细胞周期分布。按照 Annexin-V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (M3021,上海美季生物技术有限公司)的说明,按 1:2:50 比例将 Annexin-V-FITC、PI、HEPES 缓存液配成 Annexin-V-

FITC/PI 染液。每 100 μ l 染液重悬 1×10^6 个细胞,振荡混匀,室温孵育 15min 后加入 1ml HEPES 缓存液,振荡混匀。以 488nm 波长激发 525、620nm 带通滤片分别检测 FITC、PI 荧光,检测细胞凋亡情况。结果判定:左上象限为死亡细胞,左下为阴性正常细胞;右半象限为凋亡细胞,右上为晚期凋亡细胞,右下为早期凋亡细胞。

10. 划痕试验检测各组细胞迁移能力:转染后 24h,在细胞表面用 200 μ l 移液器吸管垂直划痕,无血清培养液洗涤细胞 2 次,去掉细胞碎片,置于倒置显微镜下观察并拍照,此时记为 0h。换用无血清培养基继续培养,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的饱和湿度培养箱中培养 24h 并记录,在同一观察点处观察划痕愈合情况。比较各组细胞的愈合情况,通过测量 5 个点划痕宽度,计算各组细胞迁移率。

11. Transwell 试验检测各组细胞侵袭能力:于 6 孔培养板中放入细胞侵袭小室 Transwell (装有聚碳酸酯微孔膜,孔径 8 μ m,美国 Costar 公司),用 10 μ g/ml 工型胶原 (美国 Sigma 公司) 包被 Transwell 小室底部,无菌风干。转染后 24h 收集各组细胞,将细胞稀释成 1×10^5 个/毫升的细胞悬液,取 200 μ l 接种于包被好 Matrigel 胶的 Transwell 小室的上室。下室中加入 800 μ l 含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液,置于

细胞培养箱中培养 24h。用棉签擦去微孔滤膜上层的胶,加入多聚甲醛固定 20min,结晶紫 (美国 Amresco 公司) 染色 5min。于 200 $\times$ 倒置显微镜下计数穿膜细胞,选取代表性视野拍照;以穿过无 Matrigel 覆盖滤膜细胞数为 100%,各实验组穿过膜的细胞数与其相比得出相对百分率,用此百分率表示各组细胞体外侵袭能力,每组设 3 个平行实验,实验重复 3 次。

12. 统计学方法:采用 SPSS 21.0 统计学软件进行统计分析。所有实验均独立重复 3 次,计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间比较采用方差分析,组间两两比较采用 *LSD-t* 检验。同时进行两因素效应分析时采用两因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. miR-372 和 SDC1 在胰腺癌中的表达情况:qRT-PCR 结果显示,与癌旁组织比较,胰腺癌组织中 miR-372 水平显著降低,而 SDC1 mRNA 水平显著升高 (P 均 < 0.05 ,图 1)。免疫组化显示,SDC1 阳性染色主要位于细胞核中,部分位于胞质,呈棕黄色。胰腺癌组织中的阳性表达率为 81.45% (101/124),而在癌旁组织中的表达为 13.71% (17/124),二者比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

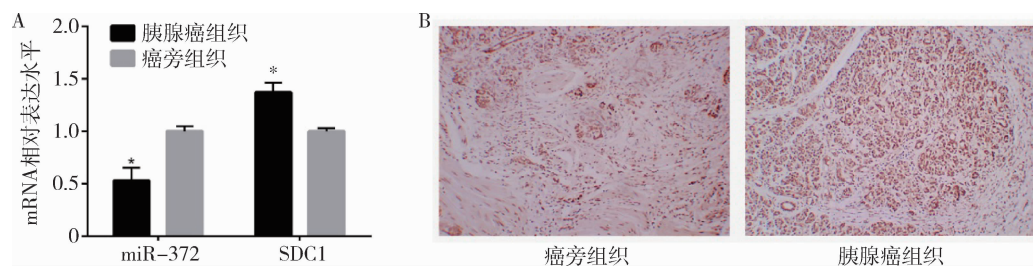


图 1 miR-372 及 SDC1 在胰腺癌及癌旁组织中的表达

A. qRT-PCR 检测胰腺癌组织及癌旁组织 miR-372 及 SDC1 mRNA 水平;B. SDC1 在胰腺癌组织及癌旁组织中的阳性染色 ($\times 400$);与胰腺癌旁组织比较, * $P < 0.05$

2. miR-372 和 SDC1 的表达与病理一般情况的关系:如表 2 所示,胰腺癌中 miR-372、SDC1 表达与肿瘤分化程度、转移和 TNM 分期显著相关 ($P < 0.05$),而与其他临床特征如性别和年龄之间没有相关性 (P 均 > 0.05)。与高分化患者比较,中低分化患者 miR-372 明显降低,SDC1 升高;与无淋巴结转移患者比较,有淋巴结患者 miR-372 明显降低,SDC1 升高;与 I ~ II 期患者比较,III ~ IV 期患者 miR-372 明显降低,SDC1 升高。

3. 细胞株筛选试验结果:SDC1 在胰腺非肿瘤细胞系 HPDE6c7 中和 PDAC 细胞系 ASPC-1、SW1990、BXP-3、CFPAC-1 和 PANC-1 中的表达如图 2。在 PDAC 细胞中,SDC1 的表达高于非肿瘤细胞中的水平 (P 均 < 0.05)。选择 SDC1 表达水平最高的 PDAC 细胞系 SW1990 用于后续试验。

4. miRNA-372 和 SDC1 基因的靶向关系验证:通过在线预测软件 microRNA.org 确定 SDC1 和相应 miR-372 结合的靶位点,SDC1 mRNA 与 miR-372

表 2 miR-372、SDC1 的表达与病理一般情况的关系

类别	例数 (n = 124)	miR-372	P	SDC1	P
年龄(岁)					
≥60	38	0.54 ± 0.10	0.674	1.36 ± 0.07	0.578
<60	86	0.53 ± 0.13		1.37 ± 0.10	
性别					
男性	77	0.52 ± 0.11	0.361	1.38 ± 0.09	0.252
女性	47	0.54 ± 0.13		1.36 ± 0.10	
分化程度					
高分化	37	0.61 ± 0.09	0.000	1.31 ± 0.07	0.000
中低分化	87	0.50 ± 0.12		1.40 ± 0.08	
淋巴结转移					
无	45	0.63 ± 0.09	0.000	1.29 ± 0.07	0.000
有	79	0.47 ± 0.09		1.41 ± 0.07	
TMN 分期					
I ~ II	52	0.62 ± 0.10	0.000	1.30 ± 0.08	0.000
III ~ IV	72	0.46 ± 0.09		1.42 ± 0.06	

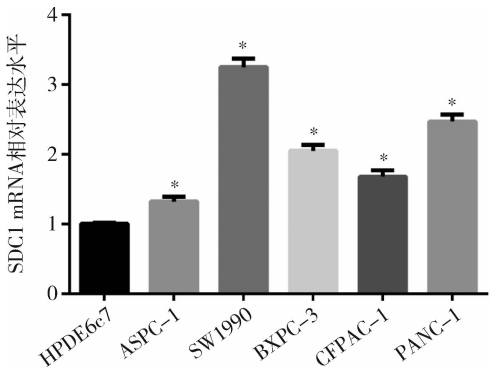


图 2 在胰腺非肿瘤细胞系 HPDE6c7 中以及在 PDAC 细胞系中 SDC1 的表达
与 HPDE6c7 比较, * P < 0.05

结合的 3'-UTR 区的序列见图 3。为证明是 miR-372 作用于预测的结合位点导致荧光素酶活性发生改变,分别设计 SDC1 3'-UTR 缺失 miR-372 结合位点的突变序列和野生序列插入报告质粒。在人胰腺癌细胞株 SW1990 共转染 miR-372mimic 和野生型(Wt-miR-372/SDC1)或突变型(Mut-miR-372/SDC1)重组质粒,结果检测发现,miR-372 mimic 对突变型 Mut-miR-372/SDC1 质粒组荧光素酶活性强度无明显影响,但野生型 Wt-miR-372/SDC1 报告质粒组荧光素酶活性强度下降,差异有统计学意义(P < 0.05,图 3)。以上结果表明,miR-372 能特异性结合 SDC1 基因。

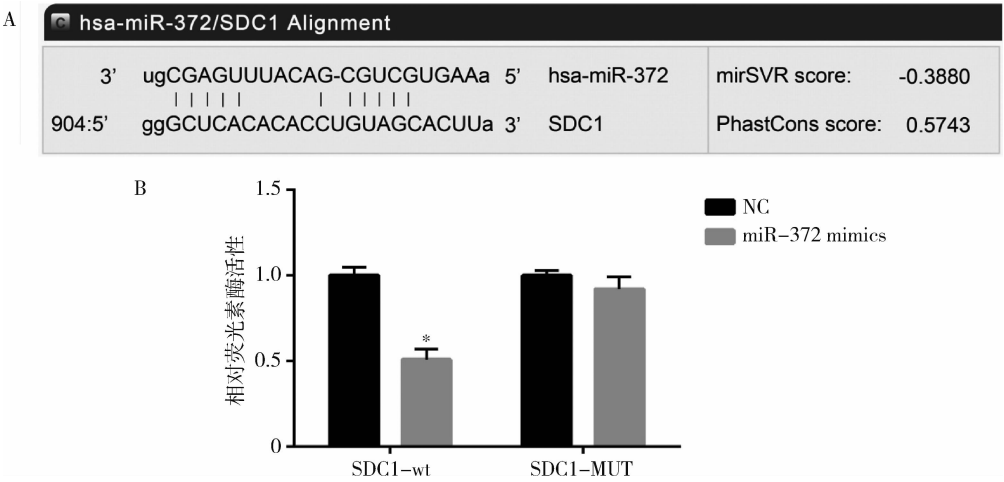


图 3 miR-372 直接靶向 SDC1 基因

A. SDC1 mRNA 与 miR-372 结合的 3'-UTR 区的序列;B. 荧光素酶活性检测;与阴性对照组比较, * P < 0.05

5. 各组细胞 SDC1、E - cadherin 和 Vimentin 的 mRNA 和蛋白表达水平: qRT - PCR 和 Western blot 法检测结果如图 4 所示, 空白对照组和阴性对照组 SDC1 和 E - cadherin 及 Vimentin 的 mRNA 和蛋白表达水平差异无统计学意义 (P 均 >0.05)。与空白对照组和阴性对照组比较, miR - 372 mimic 组和 siRNA - SDC1 组 SDC1 和 Vimentin 的 mRNA 和蛋白相对表达水平明显降低, E - cadherin mRNA 和蛋白水平明显升高 (P 均 <0.05); miR - 372 inhibitor 组 SDC1 和

Vimentin 的 mRNA 和蛋白相对表达水平明显升高, E - cadherin mRNA 和蛋白水平明显降低 (P 均 <0.05); miR - 372 inhibitor + siRNA - SDC1 组各指标与空白对照组和阴性对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。miR - 372 过表达和 SDC1 基因沉默对人胰腺癌细胞 SW1990 上皮间质转化具有明显抑制作用, 沉默 miR - 372 表达能增强 SW1990 的上皮间质转化, siRNA - SDC1 可以反转 miR - 372 inhibitor 对 SW1990 上皮间质转化的促进作用。

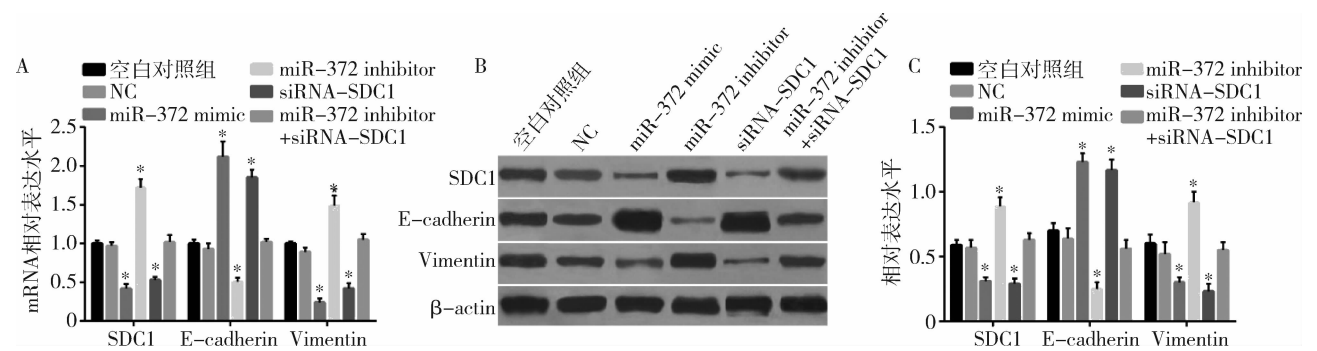


图 4 转染后各组细胞 SDC1、E - cadherin 和 Vimentin 的 mRNA 和蛋白表达情况

A. 细胞 mRNA 表达水平; B. 蛋白表达免疫印记图; C. 蛋白表达统计图; 与空白对照组和阴性对照组比较, * $P < 0.05$

6. 转染后各组细胞生长情况: CCK - 8 检测结果表明, 空白对照组和阴性对照组中细胞生长活力比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 5)。miR - 372 mimic 组和 siRNA - SDC1 组细胞生长速度明显减慢, 在 48、72h 的 A_{450} 值显著低于空白对照组和阴性对照组 (P 均 <0.05); miR - 372 inhibitor 组细胞的 A_{450} 值显著高于空白对照组和阴性对照组, 差异有统计学意义 (P 均 <0.05); 而 miR - 372 inhibitor + siRNA - SDC1 组细胞生长速度无明显变化, 与空白对照组和阴性对比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

7. 转染后各组细胞周期及凋亡情况: Annexin V/PI 双参数法检测结果详见表 3, 与空白对照组和与阴性对照组比较, miR - 372 mimic 组和 siRNA - SDC1 组 G_0/G_1 期的细胞比例显著增多, S 期及 G_2/M

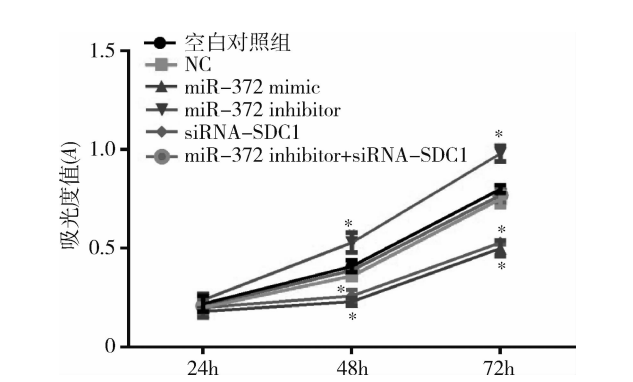


图 5 CCK - 8 检测转染后各组细胞生长的折线图

与空白对照组和阴性对照组比较, * $P < 0.05$

期显著减少, 细胞凋亡率均明显增高, miR - 372 inhibitor 组 G_0/G_1 细胞周期的细胞比例均显著减少, S

表 3 转染后胰腺癌各组细胞周期分布及凋亡情况

组别	G_0/G_1 期	S 期	G_2/M 期	凋亡率 (%)
空白对照组	53.06 $\pm$ 0.72	27.24 $\pm$ 0.81	19.70 $\pm$ 1.31	14.06 $\pm$ 0.93
阴性对照组	54.24 $\pm$ 0.46	25.29 $\pm$ 0.20	20.47 $\pm$ 0.47	12.86 $\pm$ 1.02
miR - 372 mimic 组	76.92 $\pm$ 2.09 *	12.68 $\pm$ 0.59 *	10.40 $\pm$ 1.59 *	21.27 $\pm$ 1.38 *
siRNA - SDC1 组	74.42 $\pm$ 1.45 *	13.46 $\pm$ 0.39 *	12.12 $\pm$ 1.73 *	18.69 $\pm$ 0.90 *
miR - 372 inhibitor 组	30.26 $\pm$ 0.90 *	38.75 $\pm$ 1.21 *	30.99 $\pm$ 0.31 *	8.34 $\pm$ 0.78 *
miR - 372 inhibitor + siRNA - SDC1 组	55.35 $\pm$ 0.65	26.38 $\pm$ 0.68	18.27 $\pm$ 1.30	13.48 $\pm$ 0.52

与空白对照组和阴性对照组比较, * $P < 0.05$

期及 G₂/M 期,明显增高,凋亡率均减少,差异有统计学意义 (P 均 <0.05);与空白对照组和阴性对照组比较,miR-372 inhibitor + siRNA-SDC1 组各细胞周期的细胞比例及凋亡率均无明显变化,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

8. 转染后各组细胞迁移及侵袭能力情况:细胞划痕试验和 Transwell 试验检测 miR-372 表达对人胰腺癌细胞 SW1990 迁移及侵袭能力的影响,结果如图

6 所示,空白对照组和阴性对照组中细胞迁移及侵袭能力比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与空白对照组和阴性对照组比较,miR-372 mimic 组和 siRNA-SDC1 组细胞迁移及侵袭能力明显下降,miR-372 inhibitor 组细胞迁移及侵袭能力明显上升,差异有统计学意义 (P 均 <0.05)。而 miR-372 inhibitor + siRNA-SDC1 组细胞迁移及侵袭能力无明显变化,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

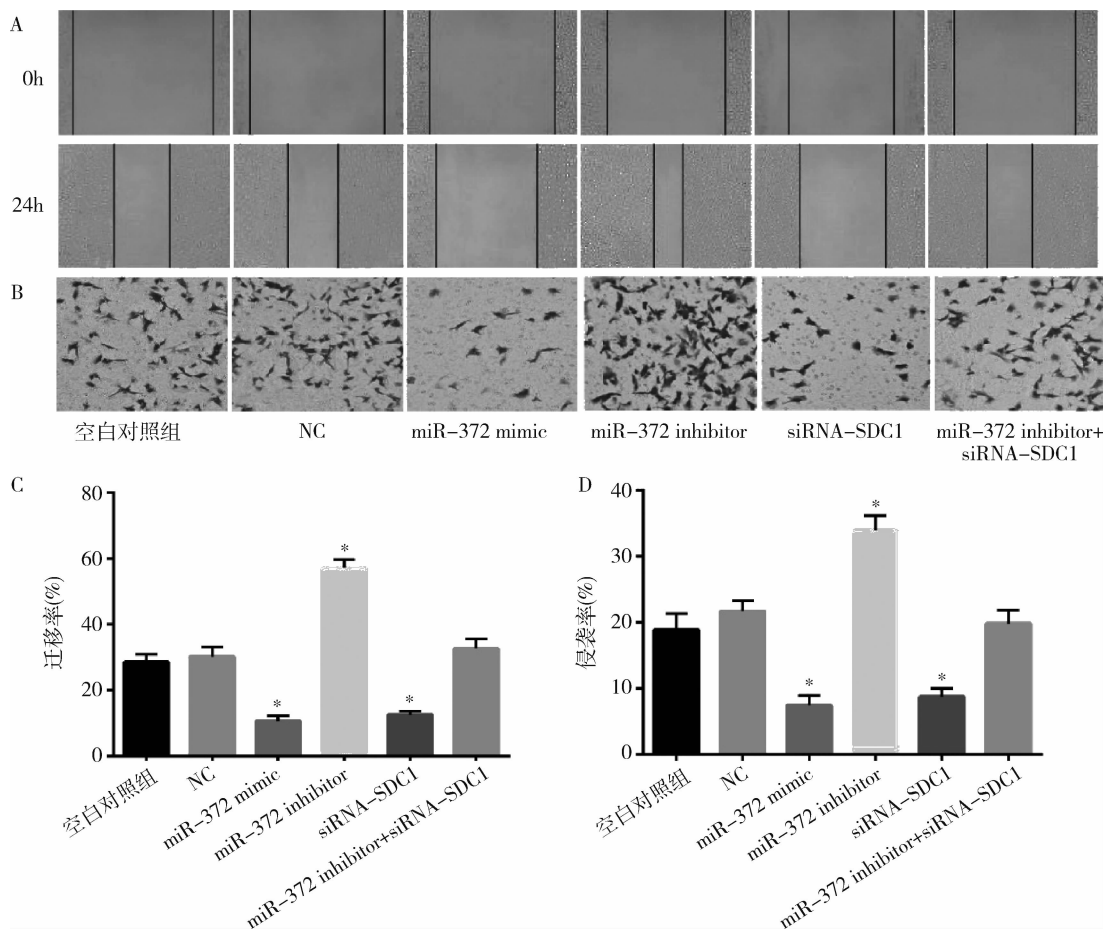


图6 转染后各组细胞的迁移及侵袭能力情况

A. 细胞迁移图;B. 细胞侵袭图;C. 细胞迁移统计图;D. 细胞侵袭统计图;与空白对照组和阴性对照组比较, * $P<0.05$

讨 论

笔者研究发现,与癌旁正常组织比较,miR-372 在胰腺癌组织中的水平显著降低。同时低表达的 miR-372 与胰腺癌的肿瘤分化程度,淋巴结转移和 TNM 分期显著相关,进一步的机制研究显示 miR-372 是通过抑制 SDC1 基因的表达,进而抑制人胰腺癌细胞上皮间质转化及侵袭的功能。

有研究发现 miR-372 在多数恶性肿瘤中呈现低表达。例如,miR-372 在肝细胞癌中呈现低表达,

并且 miR-372 被证明与肝细胞癌预后情况差和肿瘤转移有关^[12]。另外, Tian 等^[13] 研究发现, miR-372 在宫颈癌组织中也呈现低表达的趋势, miR-372 通过靶向细胞周期蛋白 A1 和 CDK2 抑制 HeLa 细胞的生长,抑制细胞周期进程。此外, miR-372 还可能作为宫颈癌的肿瘤抑制基因起作用。但是也有研究发现 miR-372 在一些癌症中的表达较高,表明 miR-372 的表达高低可能存在肿瘤异质性^[14-16]。

同时,笔者的研究发现,上调 miR-372 的表达

可以显著抑制胰腺癌细胞的增殖、侵袭和迁移,促进细胞凋亡。SDC1 以共同体方式参与细胞与细胞、细胞与细胞外基质之间的相互作用,以及细胞增殖和细胞迁移、调节组织分化和血管形成等诸多生理病理过程^[17]。有研究发现,SDC1 基因在结肠癌组织中呈高表达,并且 SDC1 可能通过抑制 EMT 途径而间接抑制结肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力,从而影响结肠癌的发展和迁移^[18]。EMT 是上皮细胞失去极性,降低细胞间的粘连,获得间质形态的一个过程^[19]。胃癌和乳腺癌等的肿瘤侵袭转移与 EMT 的发生密切相关^[20,21]。近来的研究发现,多种 miRNAs 与胰腺癌的 EMT 有着密切的联系,如 Yu 等^[22]在研究中证明 miR-200c 能够抑制胰腺癌细胞侵袭转移以及 EMT 的发生。另外有研究指出 miR-15a 可通过下调 Bmi-1 表达抑制 EMT 和胰腺癌细胞增殖^[23]。然而 miR-327 调控 SDC1 基因抑制胰腺癌 EMT 及侵袭的主要机制仍需进一步探索。

综上所述,本研究证实,miR-327 在肺腺癌细胞中呈现低表达,低表达的 miR-327 与肿瘤分化程度、淋巴结转移和 TNM 分期显著相关。并且,在增强胰腺癌细胞中 miR-327 的表达,可以负向调控 SDC1 基因,进而抑制肺腺癌 EMT 的发生,进而抑制肺腺癌的侵袭转移。因此,今后深入研究 miR-327 在胰腺癌中的侵袭转移作用及分子机制,可以为防止胰腺癌侵袭转移提供新的理论和实验依据。

参考文献

- 常志刚,韦军民,秦昌富,等. 靶向抑制表皮生长因子受体对胰腺癌细胞上皮-间质转化的影响及机制[J]. 中华实验外科杂志, 2013, 30(1):13-16
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017[J]. Ca A Cancer J Clin, 2017, 67(1):7-30
- Dan SZ. Adjuvant therapy for pancreatic cancer[J]. Cancer, 2014, 15(2):87
- Andreghetto FM, Klingbeil MF, Soares RM, et al. MicroRNAs and cell proliferation in head and neck squamous cell carcinoma[J]. BMC Proceedings, 2013, 7(Suppl 2):25
- Zheng L, Xin Y, Yang W, et al. By downregulating TIAM1 expression, microRNA-329 suppresses gastric cancer invasion and growth[J]. Oncotarget, 2015, 6(19):17559-17569
- Jia L, Liu W, Cao B, et al. MiR-507 inhibits the migration and invasion of human breast cancer cells through Fli-1 suppression[J]. Oncotarget, 2016, 7(24):36743-36754
- 孙晓婷,邹春林. 上皮间质转化在糖尿病肾病肾间质纤维化中的研究进展[J]. 中国糖尿病杂志, 2016, 24(7):655-661
- Teng HF, Aquino RS, Park PW. Molecular functions of syndecan-1 in disease[J]. Matrix Biol, 2012, 31(1):3
- Fujii T, Shimada K, Tatsumi Y, et al. microRNA-145 promotes differentiation in human urothelial carcinoma through down-regulation of syndecan-1[J]. BMC Cancer, 2015, 15(1):818
- Li R, Zhang L, Jia L, et al. MicroRNA-143 targets syndecan-1 to repress cell growth in melanoma[J]. PLoS One, 2014, 9(4):1-9
- Zhang Y, Shi J, Zeng J, et al. Percutaneous irreversible electroporation for ablation of locally advanced pancreatic cancer: experience from a Chinese institution[J]. Pancreas, 2017, 46(2):12-14
- Gang W, Wang Y, Lu X, et al. Low miR-372 expression correlates with poor prognosis and tumor metastasis in hepatocellular carcinoma[J]. BMC Cancer, 2015, 15(1):1-12
- Tian RQ, Wang XH, Hou LJ, et al. MicroRNA-372 is down-regulated and targets cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) and cyclin A1 in human cervical cancer, which may contribute to tumorigenesis[J]. J Biol Chem, 2011, 286(29):25556-25563
- Yu J, Jin L, Jiang L, et al. Serum miR-372 is a diagnostic and prognostic biomarker in patients with early colorectal cancer[J]. Anti cancer Agents Med Chem, 2016, 16(4):424
- Li G. Correlation of microRNA-372 upregulation with poor prognosis in human glioma[J]. Diagnostic Pathol, 2013, 8(1):1
- Yamashita S, Yamamoto H, Mimori K, et al. MicroRNA-372 is associated with poor prognosis in colorectal cancer[J]. Oncology, 2012, 82(4):205
- Szatmári T, Ötvös R, Hjerpe A, et al. Syndecan-1 in cancer: implications for cell signaling, differentiation, and prognostication[J]. Dis Markers, 2015, 2015(796052):2054-2067
- 陈科全,陈学清,翟国栋,等. Syndecan-1 对结肠癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响[J]. 胃肠病学, 2013, 18(7):406-410
- Shi L, Wang Y, Lu Z, et al. miR-127 promotes EMT and stem-like traits in lung cancer through a feed-forward regulatory loop[J]. Oncogene, 2016, 36(12):1631-1643
- Cai XP, Chen LD, Song HB, et al. PLK1 promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis of gastric carcinoma cells[J]. Am J Translational Res, 2016, 8(10):4172
- Skalamerna D, Dahmer-Heath M, Stevenson AJ, et al. Genome-wide gain-of-function screen for genes that induce epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(38):61000-61020
- 李晓红,陆晶晶,朱慧,等. 抑制微小 RNA-200a 表达对胰腺癌上皮-间充质转化过程的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2014, 31(10):2178-2181
- Guo S, Xu X, Tang Y, et al. miR-15a inhibits cell proliferation and epithelial to mesenchymal transition in pancreatic ductal adenocarcinoma by down-regulating Bmi-1 expression[J]. Cancer Lett, 2014, 344(1):40-46

(收稿日期:2017-09-08)

(修回日期:2017-10-10)