

· 基础论著 ·

miR-27a 通过调控 Sprouty2 促进
胰腺癌细胞 PANC-1 的生长

马怡晖 于双妮 赵武干 陈杰

【摘要】 目的 探讨 miR-27a 在胰腺癌细胞生长过程中的作用及相关机制。**方法** 应用 RT-PCR 检测胰腺癌组织中 miR-27a 的表达水平;应用 CCK-8 生长曲线和软琼脂克隆形成实验检测 miR-27a 对胰腺癌细胞 PANC-1 生长能力的影响;应用双荧光素酶报告基因实验和 Western blot 筛选 miR-27a 的靶基因。**结果** (1) 相比较于癌旁正常胰腺组织,胰腺癌组织中 miR-27a 表达显著上调;(2) 抑制胰腺癌细胞 PANC-1 内源性 miR-27a 能够显著下调癌细胞的生长活性;(3) miR-27a 能够直接调控 Sprouty2 基因 3'UTR 中的 MRE 序列;(4) 抑制 PANC-1 细胞内源性 miR-27a 能够显著上调 Sprouty2 蛋白 35%。**结论** miR-27 通过调控胰腺癌细胞 PANC-1 中 Sprouty2 蛋白表达发挥癌基因功能。

【关键词】 胰腺肿瘤; 癌基因; miR-27a; Sprouty2

MiR-27a regulates the growth of pancreatic cancer cells PANC-1 by targeting Sprouty2 MA Yi-hui, YU Shuang-ni, ZHAO Wu-gan, CHEN Jie. Department of Pathology, 1st Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

Corresponding author: MA Yi-hui, Email: allsunshine123@126.com

【Abstract】 Objective To explore the function of miR-27a in pancreatic adenocarcinoma and the possible targets. **Methods** The level of miR-27a in pancreatic adenocarcinoma tissues was detected by RT-PCR. The growth vitality of PANC-1 cells after transient transfection of miR-27a inhibitor was detected by CCK-8 and soft agar colony formation assay. The possible targets of miR-27a were chosen by dual luciferase reporter gene assay and Western blot. **Results** (1) The expression level of miR-27a in pancreatic adenocarcinoma tissues was up-regulated dramatically compared with the paired normal pancreatic tissues. (2) The growth ability of PANC-1 cells was suppressed significantly after transient transfection of miR-27a inhibitor. (3) miR-27a can regulate the MRE of Sprouty2. (4) The protein level of Sprouty2 was up-regulated significantly by 35% after transient transfection of miR-27a inhibitor in PANC-1 cells. **Conclusion** miR-27a was up-regulated in pancreatic adenocarcinoma, and it may function as an oncogene in PANC-1 cells by targeting Sprouty2.

【Key words】 Pancreatic neoplasms; Oncogenes; miR-27a; Sprouty2

MicroRNAs 是一种可以调控编码基因表达的小 RNA 分子,参与肿瘤的发生发展^[1]。近年来的研究发现,miR-27a 在多种类型恶性肿瘤中表达上调,被认为具有癌基因功能^[2-3]。人们也检测到胰腺癌中 miR-27a 存在上调表达^[4-5],但是对其在胰腺癌中的功能研究目前尚少。本研究旨在探讨认识 miR-27a 在胰腺癌细胞中的作用及可能机制。

材料与方 法

1. 试剂:RNA 提取试剂盒、SYBR Green PCR Mix、

miR-27a 前体序列及特异性 miR-27a 抑制剂(Ambion),基因组 DNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(北京天根生物有限公司),DNA 聚合酶、dNTP、各种核酸内切酶、T4 连接酶(Takara 公司),质粒提取试剂盒、lipofection2000 转染试剂、高溶点琼脂糖、lipofection2000 转染试剂(Invitrogen 公司),双荧光素酶报告基因系统(Promega 公司),兔抗人 Sprouty2 多克隆抗体(Upstate 公司),鼠抗人 β -actin 单克隆抗体(Santa cruz 公司),HPR 标记二抗(北京中山金桥生物有限公司),丙烯酰胺、N'-N'-亚甲基双丙烯酰胺、过硫酸铵、SDS(Pierce 公司),DMEM 培养基(Gibco 公司),胎牛血清(天津灏阳公司),ECL 发光液(北京普利莱公司),医用 X 光片(厦门 Koda 公司)。

2. 新鲜胰腺癌及癌旁正常胰腺组织;3 对新鲜胰

DOI:10.3877/ema.j.issn.1674-0785.2013.09.039

作者单位:450052 郑州大学第一附属医院病理科(马怡晖、赵武干);北京协和医院病理科(于双妮、陈杰)

通讯作者:马怡晖,Email:allsunshine123@126.com

腺癌及癌旁正常胰腺组织均取自北京协和医院 2009 年 6 月至 2010 年 3 月被明确诊断为胰腺导管腺癌患者的外科手术标本。新鲜组织在取出后迅速放置液氮中,然后长期贮存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

3. 细胞培养:HEK293T 细胞和胰腺癌细胞 PANC-1 用 DMEM 培养基培养于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 5% CO_2 孵箱中。

4. MicroRNA 表达水平检测:用 TRIZOL 试剂提取组织或细胞系中相应的 RNA,应用 Real Time PCR (以 U6 作为内参)检测 microRNA 表达水平。

U6 逆转录引物:5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGT-CAT-3'; miR-27a 逆转录引物:5'-GTCGTATCCAGTGCAGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGCGGAA-3'; PCR 扩增 U6 引物:5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGT-CAT-3' 和 5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3'; PCR 扩增 miR-27a 上游引物:5'-TTCACAGTGGCTAAG-3'; PCR 扩增 miR-27a 下游通用引物:5'-GTG-CAGGTCCGAGGT-3'。

反应条件:使用 SYBR[®] Green PCR Master Mix 作为核酸染料,在 IQ5 仪器上进行扩增反应。条件为 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min、 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s、 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min,循环 40 次后读数。

5. 双荧光素酶报告基因实验:按照实验要求设置合理的分组,每组分别设 3 个复孔。将所选用的细胞于转染前 24 h 传入 24 孔板,并做好分组标记;pRL-TK 重组质粒、pGL3 质粒以及 pre-miRNA 前体序列(或 pre-miRNA 表达重组质粒)均取 $0.5\text{ }\mu\text{g}$ /孔,每孔转染的质粒总量与 lipofectamine2000 试剂的比值为 3:4;转染 48 h 后,用 Luminometer 仪器测定萤火虫荧光素酶(pGL3 质粒)和花虫荧光素酶(pRL-TK 质粒)的活性,取二者的比值。

6. CCK-8 生长曲线测定:以 3000 个/孔细胞种植于 96 孔板中,将浓度为 30 nmol/L 的 miR-27a inhibitor 瞬时转染 PANC-1 细胞,同时设立 microRNA 非特异性抑制剂(control inhibitor)作为对照组。于转染后第 2、3、4、5、6、7 天加入 CCK-8 试剂检测不同处理组细胞活力。每次实验每个处理组设定 3 个复孔,实验重复 3 次。

7. 软琼脂克隆形成实验:将浓度为 30 nmol/L 的 miR-27a inhibitor 瞬时转染 PANC-1 细胞,同时设立 control inhibitor 作为对照组。于转染后 24 h 分别计数 500 个/孔种植于软琼脂平板中,每种细胞铺 2 个重复孔;置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 14~18 d,显微镜下观察克隆形成情况,选取细胞数多于 100 个的克隆进行计数;MTT 染色法对克隆染色,并照相保留实验结果。

8. Western blot 鉴定 Sprouty2 蛋白表达水平的改

变:将浓度为 30 nmol/L 的 miR-27a inhibitor 瞬时转染 PANC-1 细胞,同时设立 control inhibitor 作为对照组。于转染后 48 h 收集不同处理组的细胞,用 RIPA 裂解液处理,提取相应蛋白;应用 Western blot (以 β -actin 作为内参)检测 Sprouty2 蛋白水平,计算蛋白条带光密度值(OD)并定量分析。

9. 统计学分析:全部数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

结 果

1. 新鲜胰腺癌及癌旁组织中 miR-27a 的表达水平:为确定 miR-27a 在胰腺癌组织中的表达情况,应用 Real Time PCR 的方法对 3 例配对的胰腺癌及癌旁正常胰腺组织中 miR-27a 的表达水平进行检测。结果显示,相对于癌旁正常胰腺组织,miR-27a 在胰腺癌组织中的表达水平显著上调,差异具有统计学意义($P < 0.05$,图 1),此与以往文献报道一致^[4-5]。

2. 抑制 miR-27a 对胰腺癌细胞 PANC-1 生长能力的影响:应用 miRNA Inhibitors 转染 PANC-1 细胞,第 2、3、4、5、6、7 天后应用 CCK-8 法检测细胞生长能力,结果如图 2 所示,相对于各 control inhibitor 组,抑制 PANC-1 细胞内源性 miR-27a 后,细胞生长能力被显著抑制($P < 0.05$)。

3. 抑制 miR-27a 对胰腺癌细胞 PANC-1 克隆形成能力的影响:应用软琼脂克隆形成实验进一步评价 miR-27a 在胰腺癌细胞恶性转化过程中的作用。结果表明,转染 miR-27a inhibitor 的 PANC-1 细胞所形成的克隆数显著低于转染 control inhibitor 对照组;同时,在观察克隆大小时发现,转染 miR-27a inhibitor 组所形成的克隆明显小于 control inhibitor 组(图 3)。统计数据表明,相对于对照组,miR-27a 抑制剂对 Panc-1 细胞克隆形成能力的抑制率为 36.8% ,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

4. miR-27a 靶基因的预测及鉴定:应用 microRNA 靶基因预测软件(TargetScan, miRBase Targets 和 PicTar)对 miR-27a 靶基因进行预测,从中选出 7 个(Sprouty2, BAG2, EBF3, E2F7, PLK2, SOCS6, EDAR)与肿瘤发生发展相关的基因作为研究重点。过表达 miR-27a 后(转染 pre-miR-27a 前体序列),Sprouty2、BAG2、SOCS6 和 EDAR 等 4 个基因的 MREs 能够被 miR-27a 调控(图 4)。进一步选取并克隆 Sprouty2 基因的全长 3'UTR,对其中同 miR-27a 相互结合的 seed sequence 位点进行完全突变。结果显示,在 PANC-1 细胞中,pre-

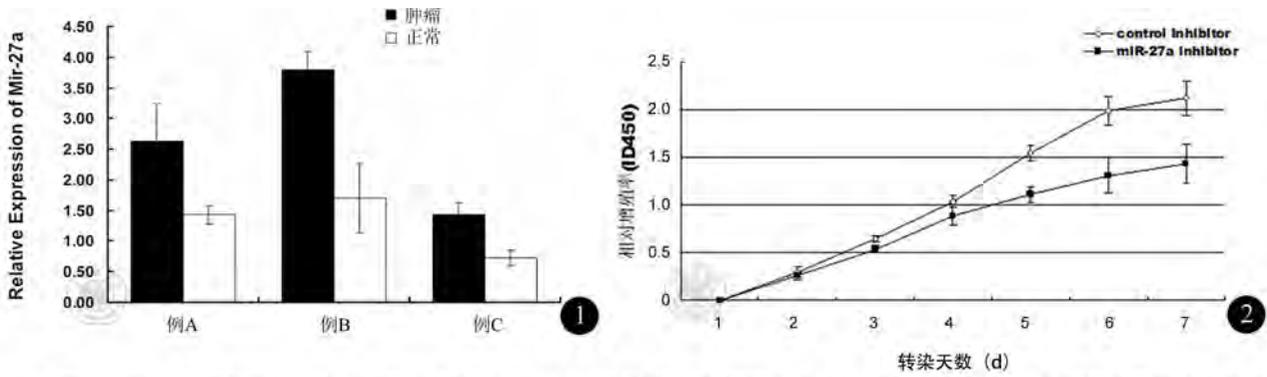


图1 3例胰腺癌组织中miR-27a相对表达水平。相对于癌旁正常胰腺组织, 3例胰腺癌中miR-27a表达显著升高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) 图2 CCK-8法检测细胞生长活性。相比较于转染control inhibitor组, 抑制内源性miR-27a活性, PANC-1细胞生长活性显著下降

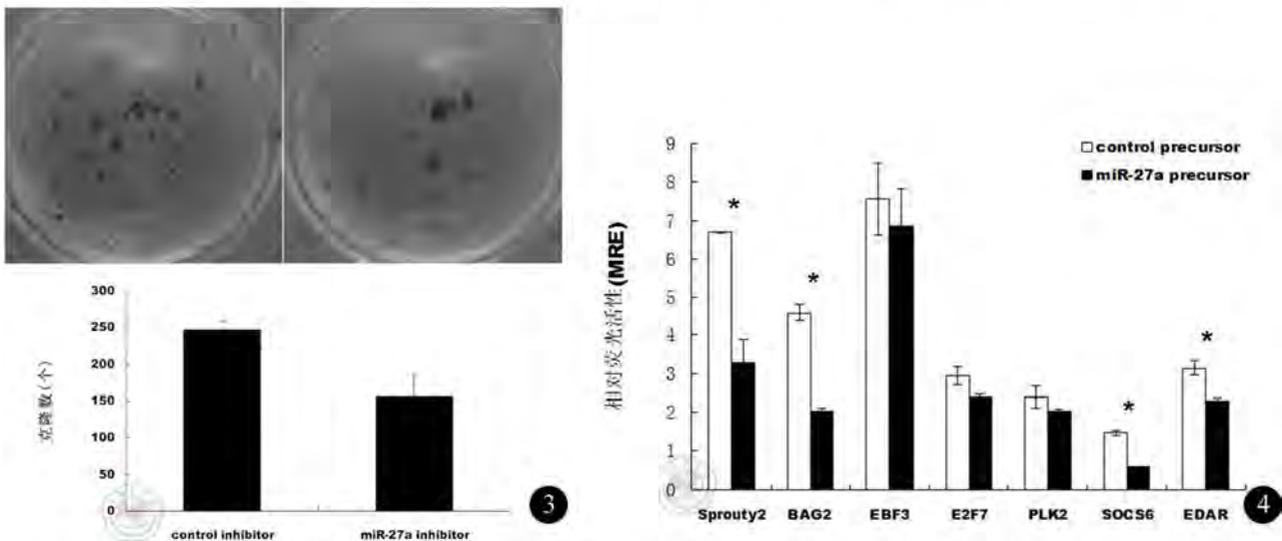


图3 软琼脂克隆形成检测细胞生长能力。相比较于control inhibitor组, 抑制内源性miR-27a活性, PANC-1克隆形成数目及大小均显著减少, 抑制率为36.8%, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) 图4 miR-27a靶基因验证。相比较于control inhibitor组, 过表达miR-27a后, Sprout2、BAG2、SOCS6和EDAR等4个基因的MREs能够被miR-27a调控

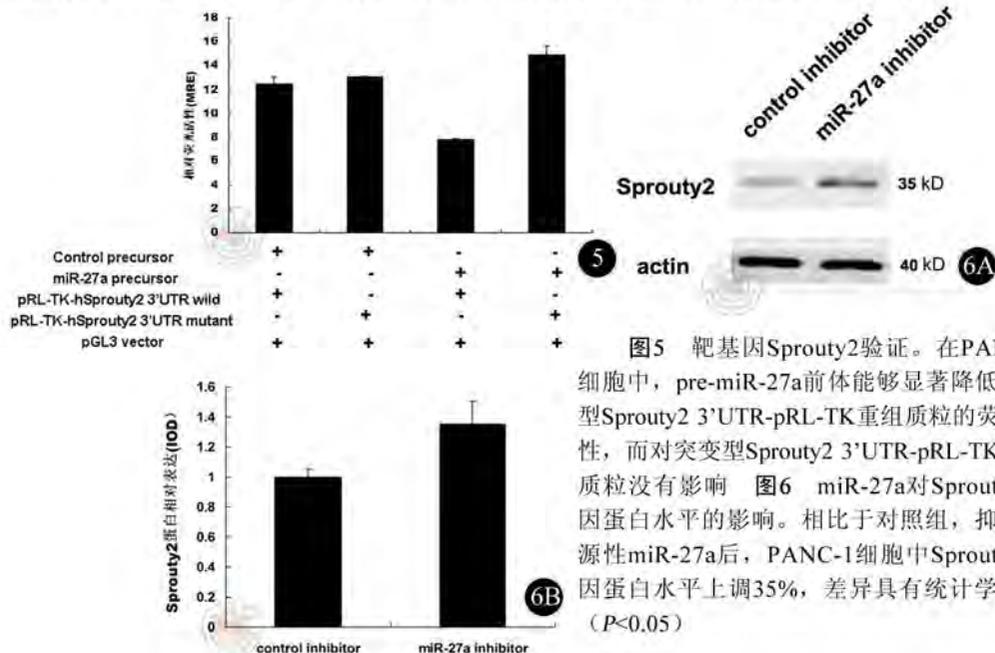


图5 靶基因Sprout2验证。在PANC-1细胞中, pre-miR-27a前体能够显著降低野生型Sprout2 3'UTR-pRL-TK重组质粒的荧光活性, 而对突变型Sprout2 3'UTR-pRL-TK重组质粒没有影响 图6 miR-27a对Sprout2基因蛋白水平的影响。相比于对照组, 抑制内源性miR-27a后, PANC-1细胞中Sprout2基因蛋白水平上调35%, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)

miR-27a 前体能够显著降低野生型 Sprouty2 3' UTR-pRL-TK 重组质粒的荧光活性,而对突变型 Sprouty2 3' UTR-pRL-TK 重组质粒没有影响(图5)。

5. 抑制 miR-27a 能够上调胰腺癌细胞 PANC-1 中 Sprouty2 基因蛋白的表达水平:结果发现,相比于对照组,抑制内源性 miR-27a 后,PANC-1 细胞中 Sprouty2 基因蛋白水平上调 35%,差异具有统计学意义($P < 0.05$),这提示 miR-27a 能够在蛋白水平直接调控 Sprouty2 蛋白的表达(图6)。

讨 论

目前多数研究证实,miR-27a 在诸如乳腺癌^[6]、胃癌^[7]、结肠癌^[8]等恶性肿瘤中表达显著上调,并在肿瘤的进展中发挥癌基因功能。本研究发现,胰腺癌组织的 miR-27a 表达水平显著高于正常胰腺组织;通过下调胰腺癌细胞 PANC-1 内源性 miR-27a,癌细胞生长及克隆形成能力均被抑制,提示 miR-27a 在胰腺癌中也可能发挥癌基因功能。

明确 microRNAs 靶基因是探讨这种小分子功能的重要手段。应用靶基因预测软件和双荧光素酶报告基因实验,本研究初步鉴定出 Sprouty2、BAG2、SOCS6 和 EDAR 等 4 个的 MREs 能够被 miR-27a 调控。BAG2 被报道在甲状腺癌中具有抵抗凋亡的作用^[9];SOCS6 在胃癌中能够通过负向调控细胞因子信号通路抑制癌细胞的生长和克隆形成能力^[10];EDAR 可以活化 NF- κ B 和 JNK 参与不依赖 caspase 的细胞凋亡途径^[11];Sprouty 蛋白家族成员通过干扰 Ras/MAPK 信号通路的活性参与调控包括血管发生、细胞生长、迁移和浸润等与肿瘤发生发展密切相关的病理过程^[12-13]。鉴于胰腺癌中存在较高频率 K-ras 癌基因的点突变和 Ras/MAPK 信号通路的异常活化,本研究将 Sprouty2 作为进一步研究的重点,最终证实 Sprouty2 是胰腺癌细胞 PANC-1 中 miR-27a 直接作用的功能靶基因。以下几个方面的实验结果可以说明:(1)3 个靶基因预测软件表明 Sprouty2 的 3'UTR 携带有与 miR-27a“种子序列”互补的结合位点;(2)过表达 miR-27a 能够显著抑制 pRL-TK 重组质粒中野生型 Sprouty2 3'UTR 上游的荧光素酶的活性,但是对“种子序列”位点突变的突变型 Sprouty2 3'UTR 没有影响;(3)在胰腺癌细胞 PANC-1 中,过表达 miR-27a 能够导致 pRL-TK 重组质粒野生型 Sprouty2 3'UTR 上游的荧光素酶的活性的显著增强;最后,转染 miR-27a 特异性抑制剂能够在翻译水平显著上调 Sprouty2 蛋白的表达。总而言之,miR-27a 能够通

过直接同 Sprouty2 基因 3' UTR 结合来参与调控 Sprouty2 的表达。由此,我们推测,Sprouty2 基因在 miR-27a 和 Ras/MAPK 信号通路之间可能起到了“桥梁”作用,miR-27a 首先影响胰腺癌中 Sprouty2 蛋白水平,后者的下调解除了其对 K-ras 活性的抑制,在一定程度上加强了 K-ras 基因对下游信号分子的活化。

本研究初步提出了 miR-27a 通过靶向作用于 Sprouty2 影响胰腺癌细胞 PANC-1 生长能力,为下一步更为深入地探讨 miR-27a 在胰腺癌中功能作用奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Cho WC. OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers. *Mol Cancer*, 2007, 6:60.
- [2] Zhang B, Pan X, Cobb GP, et al. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol*, 2007, 302:1-12.
- [3] Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6:259-269.
- [4] Zhang Y, Li M, Wang H, et al. Profiling of 95 microRNAs in pancreatic cancer cell lines and surgical specimens by real-time PCR analysis. *World J Surg*, 2009, 33:698-709.
- [5] Szafranska AE, Davison TS, John J, et al. MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene*, 2007, 26:4442-4452.
- [6] Guttilla IK, White BA. Coordinate regulation of FOXO1 by miR-27a, miR-96, and miR-182 in breast cancer cells. *J Biol Chem*, 2009, 284:23204-23216.
- [7] Liu T, Tang H, Lang Y, et al. MicroRNA-27a functions as an oncogene in gastric adenocarcinoma by targeting prohibitin. *Cancer Lett*, 2009, 273:233-242.
- [8] Chintharlapalli S, Papineni S, Abdelrahim M, et al. Oncogenic microRNA-27a is a target for anticancer agent methyl 2-cyano-3,11-dioxo-18beta-olean-1,12-dien-30-oate in colon cancer cells. *Int J Cancer*, 2009, 125:1965-1974.
- [9] Wang HQ, Zhang HY, Hao FJ, et al. Induction of BAG2 protein during proteasome inhibitor-induced apoptosis in thyroid carcinoma cells. *Br J Pharmacol*, 2008, 155:655-660.
- [10] Lai RH, Hsiao YW, Wang MJ, et al. SOCS6, down-regulated in gastric cancer, inhibits cell proliferation and colony formation. *Cancer Lett*, 2010, 288:75-85.
- [11] Schmidt-Ullrich R, Tobin DJ, Lenhard D, et al. NF-kappaB transmits Eda A1/EdaR signalling to activate Shh and cyclin D1 expression, and controls post-initiation hair placode down growth. *Development*, 2006, 133:1045-1057.
- [12] Shaw AT, Meissner A, Dowdle JA, et al. Sprouty-2 regulates oncogenic K-ras in lung development and tumorigenesis. *Genes Dev*, 2007, 21:694-707.
- [13] Tsavachidou D, Coleman ML, Athanasiadis G, et al. SPRY2 is an inhibitor of the ras/extracellular signal-regulated kinase pathway in melanocytes and melanoma cells with wild-type BRAF but not with the V599E mutant. *Cancer Res*, 2004, 64:5556-5559.

(收稿日期:2013-01-14)

(本文编辑:戚红丹)