

miRNA-375 靶向调控 *Notch1* 基因对胰腺癌细胞增殖、迁移的作用机制研究

蒋淳琪¹, 王 丹², 洪善怡¹, 胡学谦¹

(1. 宁波市中医院, 浙江 宁波 315000; 2. 上海长征医院, 上海 200003)

摘要: [目的] 探讨 miRNA-375 靶向调控 *Notch1* 基因对胰腺癌(PAAD)细胞增殖、迁移的作用机制。[方法] 选取诊断为 PAAD 并行胰腺外科手术患者 60 例, 取癌组织和癌旁组织行 HE 染色、免疫组织化学法和免疫荧光检测, 采用 PCR 法检测胰腺癌组织中 miRNA-375 和 *Notch1* 表达量, 使用 transwell 侵袭实验法和 MTT 试剂盒检测胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭性, 采用生物信息学分析和预测 miRNA-375 调控胰腺癌细胞 *Notch1* 的表达。[结果] miRNA-375 表达水平在癌组织(1.00 ± 0.07)与癌旁组织(1.65 ± 0.14)中有显著性差异($P < 0.05$); miRNA-375 表达水平与肿瘤大小、TNM 分期、淋巴结转移和远处转移有关($P < 0.05$)。qRT-PCR 检测显示 PANC-1 细胞和 BxPC-3 细胞中 miRNA-375 mimics 表达水平显著增加($P < 0.05$), 转染 3 天后 PANC-1 细胞和 BxPC-3 细胞增殖被显著抑制($P < 0.05$), 抑制率分别为 35.93% 和 27.71%; 转染 miRNA-375 使其表达水平上升可显著抑制 PANC-1 细胞和 BxPC-3 细胞的迁移能力。miRNA-375 高表达使 PANC-1 细胞水解基质胶穿透到小室下面的细胞减少 35.35%, BxPC-3 细胞减少 33.04% ($P < 0.05$)。miRNA-375 可以调控 *Notch1* 表达。利用双荧光素酶报告基因法检测 miRNA-375 与 *Notch1* mRNA 的作用关系, 转入突变 3'UTR 质粒的细胞中荧光素酶活性显著降低($t = 5.633, P = 0.039; t = 5.347, P = 0.031$), miRNA-375 直接与 *Notch1* mRNA 的 3'UTR 相互作用。[结论] 胰腺癌细胞中 miRNA-375 靶向调控 *Notch1* 表达。miRNA-375/*Notch1* 通路能够抑制胰腺癌细胞的增殖、成瘤及侵袭转移能力, 在胰腺癌细胞中发挥抑癌作用。

关键词: miRNA-375; 胰腺肿瘤; *Notch1*; 增殖; 靶向

中图分类号: R735.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2020)06-0501-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.06.B007

MiRNA-375 Regulates Proliferation and Migration of Pancreatic Cancer Cells through Targeting *Notch1* Gene

JIANG Chun-qi¹, WANG Dan², HONG Shan-yi¹, HU Xue-qian¹

(1. Ningbo Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Ningbo 315000, China; 2. Shanghai Changzheng Hospital, Shanghai 200003, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effect of miRNA375 on proliferation and migration of pancreatic cancer cells and its mechanism. [Methods] The expression of miRNA375 and *Notch1* in 60 samples of pancreatic cancer and adjacent tissues were detected by RT-PCR. The proliferation, migration and invasion were detected by MTT method and Transwell assay, respectively. The regulatory effect of microRNA375 on *Notch1* gene was predicted by bioinformatics analysis and verified by luciferase reporter gene method. [Results] The expression level of miRNA-375 in cancer tissues was lower than that in adjacent tissues (1.00 ± 0.07 vs $1.65 \pm 0.14, P < 0.05$). The expression of miRNA-375 was correlated with tumor size, TNM stage, lymph node metastasis and distant metastasis ($P < 0.05$). qRT-PCR showed that the expression level of miRNA-375 in PANC-1 cells and BxPC-3 cells increased significantly ($P < 0.05$). After 3 days of transfection, the proliferation of PANC-1 cells and BxPC-3 cells were significantly inhibited ($P < 0.05$), and the inhibition rates were 35.93% and 27.71%, respectively. The expression level of miRNA-375 increased with the transfection of miRNA-375, it can significantly inhibit the migration of pancreatic cancer PANC-1 cells and BxPC-3 cells. The high expression of miRNA-375 reduced the penetration of hydrolyzed matrix glue of PANC-1 cells into cells under the chamber by 35.35%, and that of BxPC-3 cells by 33.04% ($P < 0.05$). Using double luciferase reporter gene method to detect the relationship between miRNA-375 and *Notch1* mRNA, the luciferase activity in the mutant 3'UTR plasmid cells decreased significantly ($t = 5.633, P = 0.039; t = 5.347, P = 0.031$), which proved that miRNA-375 directly interacted with *Notch1* mRNA 3'UTR. [Conclusion] The expression of *Notch1* is specifically regulated by miRNA375 in pancreatic cancer cells. MicroRNA-375/*Notch1* pathway may inhibit the proliferation, tumorigenesis, invasion and metastasis of pancreatic cancer cells, and play an anti-cancer role in pancreatic cancer cells.

Subject words: miRNA-375; pancreatic cancer; *Notch1*; proliferation; targeting

基金项目: 国家自然科学基金(81302932)

通信作者: 胡学谦, 住院医师, 硕士; 宁波市中医院肿瘤科, 浙江省宁波市海曙区丽园北路 819 号(315000);

E-mail: huxueqian0809@163.com

收稿日期: 2019-09-20; **修回日期:** 2019-12-04

胰腺癌(pancreatic adenocarcinoma, PAAD)是恶性程度较高的消化道恶性肿瘤,其发病率和死亡率近年来呈明显上升趋势,PAAD患者5年生存率小于1%,是预后较差的恶性肿瘤之一。研究表明^[2],男性发病率稍高于女性(比例约为2.1~1.5),而绝经后的妇女则与男性发病率相近。PAAD主要发病人群为糖尿病和慢性胰腺炎患者,临床以腹痛、黄疸、消瘦乏力、腹部包块和腹水等为主要症状^[3],其病因尚不明确,有学者认为与吸烟、饮酒、高脂肪和高蛋白饮食、过量饮用咖啡、环境污染和遗传因素等有关,治疗以外科手术为主,结合放化疗等综合治疗^[4]。大量研究已证明 miRNA-375 功能对肿瘤的发生、发展和分子靶向治疗具有广阔前景,且已证实 *Notch1* 基因具有调控细胞跨膜蛋白质转运的功能,在视网膜母细胞瘤和淋巴瘤中表达水平随细胞分化程度的提高而下降^[5]。本文探讨 miRNA-375 靶向调控 *Notch1* 基因对胰腺癌细胞增殖、迁移的作用机制,以期发现 PAAD 新的治疗靶点和改善预后提供一定的临床参考依据。

1 材料与方法

1.1 一般材料

选取 2018 年 4 月至 2019 年 2 月到我院就诊并被诊断为 PAAD 的患者 60 例,且所有患者都住院行胰腺外科手术治疗,取 PAAD 患者癌组织和癌旁组织,大小约为 0.5cm×0.5cm,癌旁组织取距离癌组织边缘 5cm 以上,并用 4%多聚甲醛固定组织,后行 HE 染色、免疫组织化学法和免疫荧光检测。再次切取上述两组组织约黄豆大小,置于-80℃冰箱保存,待提取和检测基因、蛋白质。所有研究对象均签署知情同意,本试验获医院伦理委员会批准。

患者纳入标准:①自愿参加调查;②无语言交流障碍;③没有进行其他肿瘤治疗;④未合并其他内科或外科合并症者。排除标准:①入院后重大手术类患者;②认知功能障碍;④入院检查及治疗资料不全。人胰腺癌细胞株 BxPC-3、PANC-1、AsPC-1 和 SW1990 来自华中科技大学同济医学院附属协和医院胰腺病研究所保存。

1.2 仪器和试剂

深低温冰箱(海尔电器公司),酶标仪(赛默飞世

尔科技公司),HF240 二氧化碳恒温细胞培养箱(美国 Heal Force 公司),PCR 扩增仪(德国 Biometra 公司),实时荧光定量 PCR 仪(美国应用生物系统公司)。RPMI1640 培养基(Gibco 公司),免疫组化试剂盒(武汉博士德生物公司),psiCHECK-2 质粒(华大基因),双荧光素酶报告基因检测系统(Promega 公司)。

1.3 实时荧光定量 PCR

按照日本 TaKaRa 公司 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒操作手册说明书,在冰块上操作并加入各组分混匀,按照反应条件进行反应,检测 miRNA-375 的表达以 U6 为内参,Notch1 则以 GAPDH 为内参,检测数据以 ABI step-one 自带的 PCR 分析软件分析 CT 值。miRNA-375 的 CT 值 $\leq 1.54 \pm 0.23$ 为低表达,CT 值 $> 1.54 \pm 0.23$ 为高表达。

1.4 胰腺癌细胞培养

使用 RPMI1640 培养基在 37℃水温中预热,对胰腺癌细胞进行复苏处理后置于细胞培养箱中,需 37℃和 5% CO₂ 的环境培养,隔天使用显微镜观察细胞形态,弃去培养基和未贴壁细胞并更换新的培养基。后使用培养基进行细胞传代,在显微镜下每天观察细胞状态,2 天更换一次培养基。最后对处于对数生长期的细胞在-80℃低温进行长期冻存。

1.5 细胞增殖分析

使用 MTT 法对胰腺癌细胞进行分析,在 96 孔板中分别加入 MTT 20μl。在培养箱中培养 4h 后吸弃培养液,然后在每孔中加入 DMSO 150μl,阴凉处使用摇床震荡 15min,最后用酶标仪检测每个孔液体吸光度值,并计算每组 5 个孔平均值。

1.6 细胞迁移和侵袭

进行划痕实验检测胰腺癌细胞,以各个时间点肿瘤细胞相对 0 时刻的迁移距离的平均数值反映细胞迁移能力。进行 Transwell 侵袭实验,实验后使用显微镜计算细胞数量,取 5 个视野内细胞数均值代表肿瘤细胞侵袭能力。

1.7 双荧光素酶报告基因检测

通过生物信息学分析,确定 Notch1 mRNA 3' UTR 与 miRNA-375 之间存在结合位点。将 Notch1 mRNA 3' UTR (GUUUUAAAACACAUGUUUUUAU) 与突变后的 3' UTR (GUUUUAAAACACAUGUUTUAU) 链接到 psiCHECK-2 质粒上分别作为对照组与实验组,转染入细胞系 PANC-1、BxPC-3 细胞系中,培养

3d后检测荧光素酶活性。

1.8 统计学处理

研究资料使用 EPidata3.1 软件录入,并用 SPSS 21.0 统计软件进行分析,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间分析采用 χ^2 检验和 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miRNA-375在胰腺癌组织和细胞系中的表达

使用实时荧光定量 PCR 检测胰腺癌组织(PC)标本和癌旁组织(NC)中 miRNA-375 的表达水平,癌组织(1.00 ± 0.07)中表达水平较癌旁组织(1.65 ± 0.14)降低($t=10.172, P=0.001$)。见 Figure 1。

2.2 miRNA-375表达水平与 PAAD 病理临床特征的关系

PAAD 患者癌组织中 miRNA-375 表达水平在不同肿瘤大小、TNM 分期、淋巴结转移和远处转移组间差异有统计学意义($P<0.05$)。见 Table 1。

2.3 miRNA-375抑制胰腺癌细胞增殖能力

PANC-1 细胞和 BxPC-3 细胞中 miRNA-375 mimics 表达水平显著性增加($P<0.05$),分别为 18.08 倍和 16.33 倍 ($t=267.288, t=239.902, P$ 均 <0.05),见 Figure 2。转染 3d 后,MTT 法检测转染 miRNA-375 后细胞增殖水平,发现 PANC-1 细胞和 BxPC-3 细胞增殖被显著抑制,抑制率分别为 35.93%和 27.71% ($t=5.623, P=0.004; t=4.3364, P=0.002$),见 Figure 3。

Table 1 The relationship between miRNA-375 expression level and clinicopathological features of PAAD

Features	n	Expression of miRNA-375		χ^2	P
		High	Low		
Tumor size(cm ²)					
<2	25	14	11	4.571	0.033
≥2	35	10	25		
TNM staging					
I + II	20	13	7	7.813	0.005
III +IV	40	11	29		
Lymph node metastasis					
Yes	33	9	24	4.949	0.026
No	27	15	12		
Distant metastasis					
Yes	39	9	30	13.297	<0.001
No	21	15	6		

2.4 miRNA-375表达水平与胰腺癌细胞的迁移、侵袭能力的关系

转染 miRNA-375 使其表达水平上升后发现可以显著性抑制 PANC-1 细胞和 BxPC-3 细胞的迁移能力,在细胞系中转染类似物 miRNA-375 mimics 后

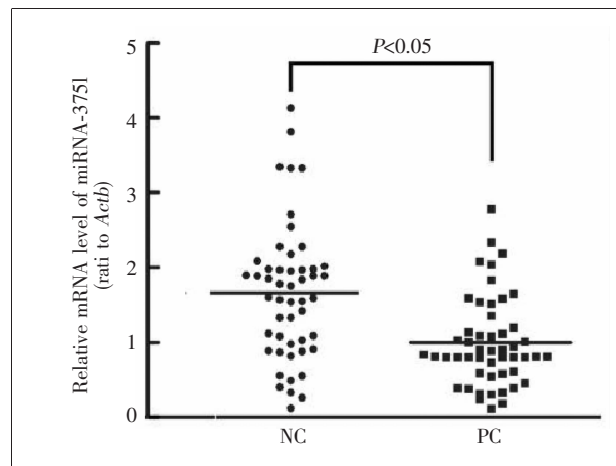


Figure 1 The expression of miRNA-375 in two groups

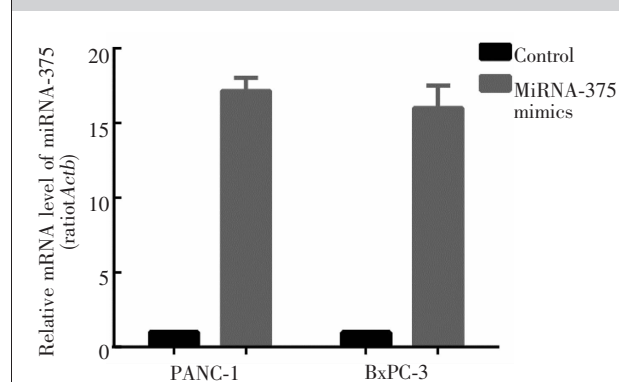


Figure 2 MiRNA-375 expression in PANC-1 and BxPC-3 cells

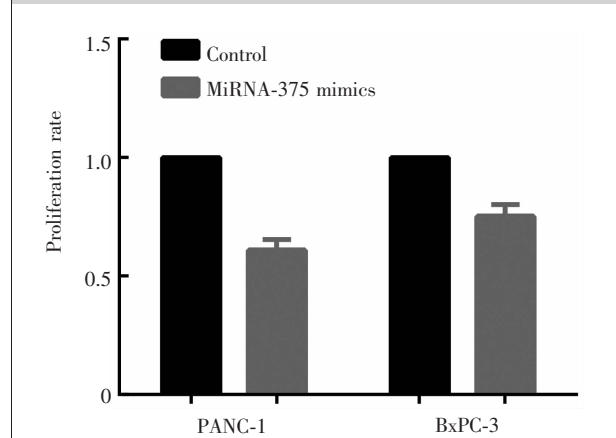


Figure 3 Relationship between proliferation and miRNA-375 expression of PANC-1 cells and BxPC-3 cells

发现迁移能力分别被抑制 44.39% 和 32.92%, 见 Figure 4。transwell 侵袭实验结果显示, miRNA-375 高表达使 PANC-1 细胞水解基质胶穿透到小室下面的细胞减少 35.35%, BxPC-3 细胞减少 33.04% ($t=5.532, t=5.171, P$ 均 <0.05)。见 Figure 5。

2.5 miRNA-375 调控胰腺癌细胞 Notch1 的表达

使用生物信息学分析和预测 miRNA-375 与 Notch1 mRNA 的 3'UTR 结合, 结果提示 miRNA-375 可以调控 Notch1D 的表达, 见 Figure 6。利用双荧光素酶报告基因法检测 miRNA-375 与 Notch1 mRNA 的作用关系, 转入突变 3'UTR 质粒的细胞中荧光素酶活性显著降低 ($t=5.633, P=0.039; t=5.347, P=0.031$), 证明 miRNA-375 直接与 Notch1 mRNA 的 3'UTR 相互作用。见 Figure 7。

3 讨论

胰腺作为人体重要的消化和内分泌器官, 是一个狭长的腺体, 横卧在人体上腹部腹膜后, 主要分泌胰液、胰高血糖素和胰岛素, 负责人体消化和调节血糖等^[6]。PAAD 具有较高的死亡率, 且近年来全世界范围患者的数量明显增多^[7], 死亡率高的原因有几点: (1) PAAD 在早期几乎没有任何严重的特异性症状, 只有上腹部性质模糊的隐痛、钝痛和饱胀不适等, 因此在没有进行相关影像学 and 肿瘤标志物检查时, 难以对其做早期诊断^[8]; (2) PAAD 治疗效果差^[9], 据统计^[10-11], 没有接受治疗的 PAAD 患者生存期仅 4 个月左右, 而即使接受了手术的患者生存期也只有 16 个月, PAAD 一度被称国际医学称为: “21 世纪的顽固堡垒”。

miRNA 自 1993 年被发现具有潜在调控蛋白作用和被证实参与细胞增殖、凋亡和分化等后, 开始广泛研究 miRNA 靶基因调控机制^[12-13]。miRNA-375 在肿瘤中的研究较少, 在胰腺癌中的作用亦少见分析。

本研究结果显示, miRNA-375 表达在癌组织 (1.00 ± 0.07) 与癌旁组织 (1.65 ± 0.14) 中有显著性差异 ($P < 0.05$), miRNA-375 表达水平与肿瘤大小、TNM 分期、淋巴结转移和远处转移有关 ($P < 0.05$), 提示 PAAD 与 miRNA-375 相关。本文使用生物信息学分析和预测 miRNA-375 与 Notch1 mRNA 的 3'UTR 结合, 提示 miRNA-375 可以调控 Notch1D 的

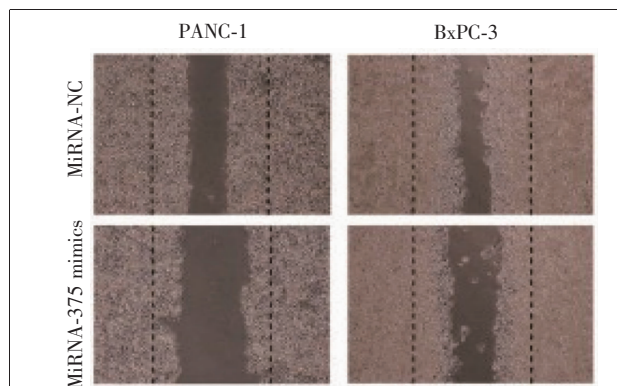


Figure 4 Relationship between miRNA-375 expression and migration ability of pancreatic cancer cells

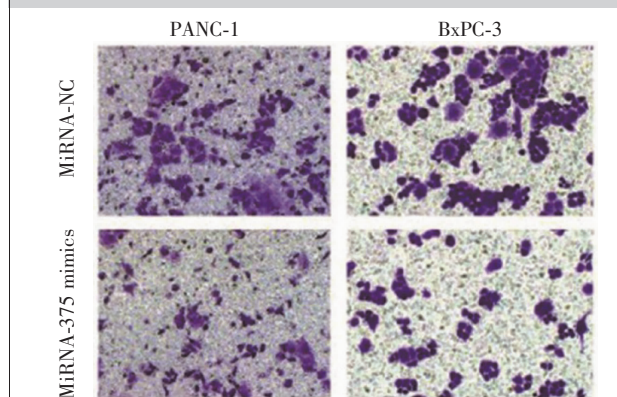


Figure 5 Relationship between miRNA-375 expression and invasion of pancreatic cancer cells

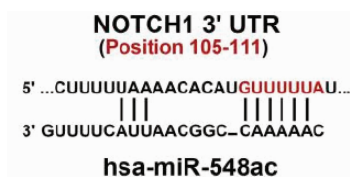


Figure 6 MiRNA-375 regulates the expression of Notch 1 in pancreatic cancer cells

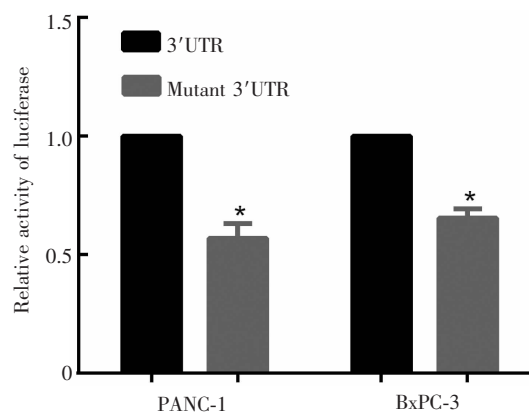


Figure 7 Detection of the interaction between miRNA-375 and Notch1 mRNA by dual luciferase reporting system

表达。通过构建双荧光素酶报告系统,转入 Notch1 mRNA 突变后 3'UTR 质粒的两种细胞系中,荧光素酶活性均显著降低,证明 miRNA-375 能靶向调控 Notch1 mRNA。因为 Notch1 信号通路在维持 PAAD 细胞的增殖、分化和凋亡等活动以及胚胎发育、血管发生和肿瘤形成等生理过程中发挥了重要的作用,且其受体在包括白血病、结直肠癌和肺癌等多种肿瘤中具有促癌作用,Notch1 是潜在的靶点^[14]。使用 qRT-PCR 检测发现 PANC-1 细胞和 BxPC-3 细胞中 miRNA-375 mimics 表达水平显著增加($P<0.05$),转染 3 天后 PANC-1 细胞和 BxPC-3 细胞增殖被显著抑制($P<0.05$),提示 miRNA-375 表达水平与细胞增殖能力相关。

PAAD 因其具有早期易转移和临床进展迅速等特点,PAAD 患者难以早期诊断,且恶性程度高和预后差,因此本文进一步关注 miRNA-375 对 PAAD 迁移、侵袭转移的作用,结果显示,转染 miRNA-375 使其表达水平上升发现可显著性抑制 PANC-1 和 BxPC-3 细胞的迁移能力,miRNA-375 水平高表达使 PANC-1 细胞水解基质胶穿透到小室下面的细胞减少 35.35%,BxPC-3 细胞减少为 33.04%,表明高水平 miRNA-375 可显著抑制胰腺癌细胞侵袭能力($P<0.05$)。

综上所述,胰腺癌细胞内 miRNA-375 靶向调控 Notch1 的表达,miRNA-375/Notch1 通路能够抑制胰腺癌细胞的增殖及侵袭转移,在胰腺癌细胞中发挥抑癌作用。

参考文献:

- [1] Li XJ. The effect of miR-183 targeting MTA1 gene on the proliferation and migration of osteosarcoma cells [D]. Zhengzhou:Zhengzhou University,2017.[李欣洁. miR-183 靶向调控 MTA1 基因对骨肉瘤细胞增殖及迁移的影响[D].郑州:郑州大学,2017.]
- [2] Xu L,Li H,Su L,et al. MicroRNA-455 inhibits cell proliferation and invasion of epithelial ovarian cancer by directly targeting Notch1 [J]. Mol Med Rep,2017,16(6): 9777-9785.
- [3] Liang S,Gong XJ,Huang GW,et al. Microrna-140 targeting high mobility group protein B1 regulates the growth and proliferation of pancreatic cancer cells [J]. Chinese Journal of Experimental Surgery,2018,35(6):1070-1073. [梁帅,龚学军,黄耿文,等. 微小 RNA-140 靶向高迁移率蛋白 B1 调控胰腺癌细胞生长增殖[J]. 中华实验外科杂志,2018,35(6):1070-1073.]
- [4] Zhao L,Liu B. Identification of potential prognostic ceRNA module biomarkers in patients with pancreatic adenocarcinoma[J]. Oncotarget,2017,8(55):94493-94504.
- [5] Qin HX,Li SP,Zhang QH,et al. The effect of miRNA-375 targeting phosphatidylinositol kinase-3 catalytic subunit α on the proliferation and migration of cervical cancer cells [J]. Chinese Journal of Modern Medicine,2018,28(33): 35-40.[秦海霞,李少平,张全华,等. miRNA-375 靶向磷脂酰肌醇激酶-3 催化亚单位 α 对宫颈癌细胞增殖和迁移的影响[J]. 中国现代医学杂志,2018,28(33):35-40.]
- [6] Peta E,Sinigaglia A,Masi G,et al. HPV16 E6 and E7 up-regulate the histone lysine demethylase KDM2B through the c-MYC/miR-146a-5p axis[J]. Oncogene,2018,37(12): 1654-1668.
- [7] Li W,Liu X,Zhang G,et al. Mechanism of chlorogenic acid in apoptotic regulation through notch1 pathway in non-small cell lung carcinoma in animal level [J]. Zhongguo Fei Ai Za Zhi,2017,20(8):555-561.
- [8] Wen Z,Tan BB,Li Y,et al. The role and mechanism of microrna-95 in the proliferation and apoptosis of gastric cancer cells [J]. Chinese Journal of Experimental Surgery, 2019,36(4):748-751.[温转,檀碧波,李勇,等. 微小RNA-95 在胃癌细胞增殖、凋亡中的作用及其机制[J]. 中华实验外科杂志,2019,36(4):748-751.]
- [9] Nie Z,Li L,Yang LQ,et al. Study on the expression of psat1 and its mechanism of cell proliferation and invasion in pancreatic cancer [J]. Cancer Clinic of China,2018,45(23):13-19.[聂钊,李岚,杨兰群,等. 胰腺癌组织中 PSAT1 表达及其介导的细胞增殖侵袭作用机制研究[J]. 中国肿瘤临床,2018,45(23):13-19.]
- [10] Salignon J,Richard M,Fulcrand E,et al. Genomics of cellular proliferation in periodic environmental fluctuations [J]. Mol Syst Biol,2018,14(3):e7823.
- [11] Zhu JY,Hou M,Yu ZP,et al. MiR-124 targeted regulation of Notch 1 pathway on the proliferation and migration of hepatocarcinoma cells [J]. Journal of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery,2018,30(5):53-56,79.[朱剑宇,侯萌,余正平,等. miR-124 靶向调控 Notch 1 通路影响肝癌细胞的增殖和迁移[J]. 肝胆胰外科杂志,2018,30(5): 53-56,79.]
- [12] Liu C,Wu H,Li Y,et al. SALL4 suppresses PTEN expression to promote glioma cell proliferation via PI3K/AKT signaling pathway[J]. J Neurooncol,2017,135(2):263-272.
- [13] Zhu J,Gu Y,Liu YF,et al. Expression of Ect2 gene in human pancreatic ductal adenocarcinoma and its effect on biological characteristics of pancreatic cancer cells [J]. Chinese Journal of Tumor Biotherapy,2019,26(5):45-50. [朱婕,顾炎,刘艳芳,等. ECT2 基因在人胰腺导管腺癌中的表达及对胰腺癌细胞生物学特性的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2019,26(5):45-50.]
- [14] Ji WW,Guo DK,Song Z,et al. Inhibitory effect of microrna-127 on pancreatic cancer cells and its mechanism [J]. Chinese Journal of Experimental Surgery,2017,34(12): 2154-2157.[吉文伟,郭德凯,宋展,等. 微小 RNA-127 对胰腺癌细胞的抑制作用及其机制 [J]. 中华实验外科杂志,2017,34(12):2154-2157.]