

MiR-183 调控 PDCD4 表达对 SW1990 胰腺癌 细胞生长的调节作用

陆颖影, 曾 悦, 郑俊媛, 黄春兰, 王兴鹏[△]

南京医科大学附属上海一院临床医学院 消化内科(上海 200080)

【摘要】 目的 观察 miR-183 在体外通过靶向调控程序性细胞死亡因子 4(PDCD4)对 SW1990 胰腺癌细胞生长的调节作用。**方法** 将不同浓度的 miR-183 模拟物(miR-183 mimics)和拮抗剂(miR-183 inhibitors)通过细胞转染技术转入 SW1990 胰腺癌细胞株中,筛选出合适浓度,进一步应用实时荧光定量 PCR(qPCR)和 Western blot 检测 PDCD4 基因和蛋白表达水平;MTT 法检测 miR-183 inhibitors 对 SW1990 细胞生长的影响,流式细胞术和 Hoechst 染色检测 SW1990 细胞凋亡和细胞周期,Western blot 检测抗凋亡基因 bcl-2 蛋白的表达。**结果** 细胞转染 50 nmol/L miR-183 mimic 和 150 nmol/L inhibitor 后,miR-183 基因的表达量与对照比较差异有统计学意义($P<0.05$)。qPCR 和 Western blot 发现 miR-183 mimics 能下调 PDCD4 的表达,而 miR-183 inhibitors 能上调 PDCD4 的表达,下调 bcl-2($P<0.05$)。MTT 法显示 miR-183 inhibitors 能抑制细胞增殖,流式细胞术和 Hoechst 染色显示 miR-183 inhibitors 能促进胰腺癌细胞的凋亡及阻滞细胞周期于 G_0/G_1 期。**结论** miR-183 拮抗剂体外能抑制胰腺癌细胞增殖,促进凋亡和阻滞细胞周期,且可能通过靶向调节 PDCD4 基因发挥其调节作用。

【关键词】 胰腺癌 MiR-183 细胞凋亡 细胞周期 PDCD4

MiR-183 Regulates Proliferation of SW1990 Pancreatic Cancer Cell Line by Targeting PDCD4 LU Ying-ying, ZENG Yue, ZHENG Jun-yuan, HUANG Chun-lan, WANG Xing-peng[△]. Department of Gastroenterology, Shanghai General Hospital of Nanjing Medical University, Shanghai 200080, China

[△] Corresponding author, E-mail: richardwangxp@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of miR-183 on the cell proliferation in SW1990 pancreatic cancer cell line by targeting programmed cell death factor 4(PDCD4). **Methods** The SW1990 pancreatic cancer cells were transfected with miR-183 mimics and inhibitors at different concentrations, the alteration of PDCD4 levels was observed at specific concentrations by qPCR and Western blot. The cellular proliferation of transfected cells was determined by MTT assay. The distribution of cell cycle and apoptosis was examined by flow cytometry (FCM) and Hoechst 33258 staining. The expression of B-cell lymphoma (bcl-2) was evaluated by Western blot. **Results** The miR-183 mimic and inhibitor (at concentrations of 50 nmol/L or 150 nmol/L) showed significantly increasing or decreasing effects on the levels of miR-183 respectively. The expression of PDCD4 was downregulated in the cells transfected with miR-183 mimics, while significantly upregulated in the cells treated with miR-183 inhibitors. Western blot showed that miR-183 inhibitors resulted in a marked decrease in the expression levels of bcl-2. The growth of SW1990 cells was obviously inhibited after anti-miR-183 treatment, while an increase of apoptosis cells proportion and cell cycle G_0/G_1 arrest were observed after miR-183 inhibitors transfection. **Conclusion** The miR-183 inhibitors could restrain cell proliferation, promote cell apoptosis and increase G_0/G_1 arrest in SW1990 pancreatic cancer cells, which may be possibly through targeting PDCD4.

【Key words】 Pancreatic cancer MiR-183 Apoptosis Cell cycle PDCD4

胰腺癌是目前恶性程度最高的肿瘤之一,发病率在世界范围内(包括中国)呈明显上升趋势,且胰腺位于后腹膜,起病隐匿,临床症状出现时往往已经伴全身转移,患者的 5 年生存率极低,仅为 5%~10%,中位生存期约为明确诊断后 5~6 月^[1]。MicroRNA(miRNA)是一组长度为 17~25 个核苷

酸的非编码小 RNA,已有大量研究指出,miRNA 可以调控特定基因表达从而影响细胞增殖、分化和凋亡,发挥类似原癌基因或抑癌基因的作用^[2],miRNA 的调控失常是引起肿瘤发生和转移的重要因素之一^[3]。有研究表明,miR-183 参与抑制某些肿瘤的转移^[4],但在胰腺癌中 miR-183 的作用尚无相关报道。本研究通过在胰腺癌细胞中转染 miR-183 模拟物(mimics)或拮抗剂(inhibitors),观察其

[△] 通信作者, E-mail: richardwangxp@163.com

对癌细胞生长、凋亡和细胞周期的影响,并进一步探讨 miR-183 是否通过调控抑癌基因程序性细胞死亡因子 4(PDCD4)来实现其作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

RPMI-1640 培养基购自美国 Gibco 公司。TRIzol、Lipofectamine 2000 试剂购自美国 Invitrogen 公司。Taq DNA Polymerase 购自美国 Thermo Fisher 公司,miR-183 mimics、miR-183 inhibitors 由南京凯基生物公司提供。SybrGreen 荧光染料购自北京天根公司。Annexin-V FITC/PI 试剂盒、Hoechst 33258 染色液购自上海碧云天。PDCD4 和 bcl-2 蛋白一抗、二抗购自南京凯基生物。

1.2 细胞及培养

人胰腺癌细胞 SW1990 由南京凯基生物科技发展有限公司提供。于 10% 胎牛血清的完全培养液 DMEM(含 100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素)中,37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% 的 CO₂、饱和湿度条件下培养。

1.3 细胞分组及转染

取处于对数生长期的 SW1990 细胞接种于 6 孔板中,待细胞汇合度达 30%~50% 时进行转染。分组为:空白组(不对 SW1990 细胞进行转染)、阴性对照组(miR-183 mimics NC,转染无义序列)、miR-183 模拟物组(miR-183 mimics,转染 miR-183 mimics)、拮抗剂阴性对照组(miR-183 inhibitors NC,转染无义序列)和 miR-183 拮抗剂组(miR-183 inhibitors,转染 miR-183 inhibitors)。转染步骤按照 Lipofectamine 2000 试剂说明书操作,分别使 miR-183 mimics 的转染终浓度为 20 nmol/L、30 nmol/L、50 nmol/L,使 miR-183 inhibitors 的转染终浓度分别为 50 nmol/L、100 nmol/L、150 nmol/L,6 h 后更换完全培养基继续培养,转染 48 h 后通过实时荧光定量 PCR(qPCR)检测转染对 miR-183 基因表达的影响,筛选出合适浓度进行后续实验。

1.4 qPCR 检测 miR-183 和 PDCD4 基因的表达

按 1.3 分组,qPCR 检测 miR-183 基因的表达;筛选 miR-183 mimics 和 miR-183 inhibitors 合适浓度进行细胞转染后,qPCR 检测 PDCD4 基因的表达。细胞转染后 48 h,弃去培养基,加入 1 mL 预冷的 TRIzol,提取细胞总 RNA,并随即反转录合成 cDNA,用 SybrGreen 做荧光染料,qPCR 法检测基

因的表达。内参基因为 U6 RNA。相关引物,miR-183: TTTGGCACTAGCACATTTTGTCT; U6 RNA: CACCACGTTTATACGCCGGTG; GAPDH (115 bp),上游 5'-CATCTTCTTTTGCCTCGC CA-3',下游 5'-TTAAAAGCAGCCCTGGTGACC-3'; PDCD4 (126 bp),上游 5'-AAAGGGAAGGT TGCTGGATA-3',下游 5'-TCCACCTCCTCCACA TCATA-3'。反应体系 20 μ L,扩增反应条件:95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 20 s,72 $^{\circ}$ C 40 s,40 个循环反应。目的基因的表达采用相对定量法,即以 U6 RNA 作为内参,计算 Δ Ct,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示目的基因的相对表达量。

1.5 Western blot 检测 PDCD4 和 bcl-2 蛋白表达

采用 Western blot 检测 PDCD4(筛选的 miR-183 mimics 和 miR-183 inhibitors 合适浓度进行细胞转染)和 bcl-2 蛋白(筛选的 miR-183 inhibitors 合适浓度进行细胞转染后)的表达。培养 48 h 后,细胞用胰酶消化后,加入 200 μ L 冰预冷裂解缓冲液,混匀后冰浴 30 min,每隔 5 min 涡旋震荡 10 s,充分裂解。离心:4 $^{\circ}$ C,13 000 $\times g$,10 min。收集上清,BCA 法测定蛋白浓度。用湿转法将样品蛋白转移至 PVDF 膜上,以脱脂奶粉封闭 1.5 h,TBST 液充分洗膜后加特异性一抗,一抗稀释比例为(1:1 000),放置于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,二抗羊抗兔 IgG(1:10 000)室温孵育 2 h 后,TBST 液充分洗膜并加 ECL 发光液充分显影,凝胶成像仪(美国 BIO-RAD Gel Doc XR)曝光,测定各显色条带的灰度值。以各组目的蛋白灰度值与 GAPDH 灰度值的比值为目的蛋白表达的相对含量。实验重复 3 次。

1.6 MTT 法检测细胞增殖

筛选的 miR-183 inhibitors 合适浓度进行细胞转染后,取处于对数生长期的各组细胞以 5×10^4 mL⁻¹ 的密度铺种于 96 孔板,每孔加入 100 μ L 细胞悬液,置于 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% 的 CO₂ 培养箱中培养 24 h。用培养基稀释 miR-183 inhibitor 至 150 nmol/L,每孔加入 200 μ L 相应的含药培养基,继续培养 24、48、72 h,每孔加入 20 μ L MTT(5 mg/mL),继续孵育 4 h,每孔加入 150 μ L DMSO 溶解,振荡混匀后以酶标仪测定吸光度(A₄₉₀)值,计算抑制率。设立阴性对照组(不予药物干预对照组)。抑制率%=(A_{阴性对照组}-A_{实验组})/A_{阴性对照组} $\times 100\%$ 。

1.7 Annexin-V FITC/PI 法测细胞凋亡和细胞周期

对数生长期的细胞消化接种到 6 孔板中,设立

miR-183 inhibitors(筛选的 miR-183 inhibitors 合适浓度)组和阴性对照组,培养 48 h 后,用 0.25%胰酶(不含 EDTA)消化收集细胞,PBS 洗涤细胞二次(离心 2 000 r/min,5 min),收集 5×10^5 细胞,加入 500 μ L Binding Buffer 悬浮细胞,加入 5 μ L Annexin V-FITC 混匀后,加入 5 μ L Propidium Iodide(PI),混匀,室温、避光、反应 5~15 min;用流式细胞仪检测细胞凋亡的情况。细胞周期检测:收集 5×10^5 细胞制备单细胞悬液,用体积分数为 70%乙醇固定 2 h,4 $^{\circ}$ C 保存,染色前用 PBS 洗去固定液(如需要,细胞悬液用 200 目筛网过滤 1 次),加 100 μ L RNase 37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min,再加入 400 μ L PI 染色混匀,4 $^{\circ}$ C 避光 30 min;上机检测,记录激发波长 488 nm 处红色荧光。

1.8 Hoechst 法检测细胞凋亡

按 1.7 设立 miR-183 inhibitors 组和阴性对照组。培养 48 h 后,细胞浸入体积分数 4%的多聚甲醛固定液中过夜,改善细胞的渗透性,PBS 清洗 3 次,加入适量 Hoechst 33258 染色液,充分覆盖住细胞,室温放置 10 min,PBS 清洗 3 次,封片后荧光显

微镜下观察。

1.9 统计学方法

计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用 *t* 检验,多组间采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SW1990 胰腺癌细胞转染后 miR-183 基因的表达

SW1990 胰腺癌细胞转染不同浓度的 miR-183 mimics 及 inhibitors 48 h 后,qPCR 检测发现,转染 miR-183 mimics 20~50 nmol/L 浓度范围内,miR-183 基因的表达逐渐增加,在转染 miR-183 mimic 50 nmol/L 时,miR-183 的表达与空白组、阴性对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);而转染 miR-183 inhibitor 50~150 nmol/L 浓度范围内,miR-183 基因的表达逐渐降低,在转染 miR-183 inhibitors 150 nmol/L 时,miR-183 的表达与空白组、阴性对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。因此,后续实验选择 miR-183 mimic

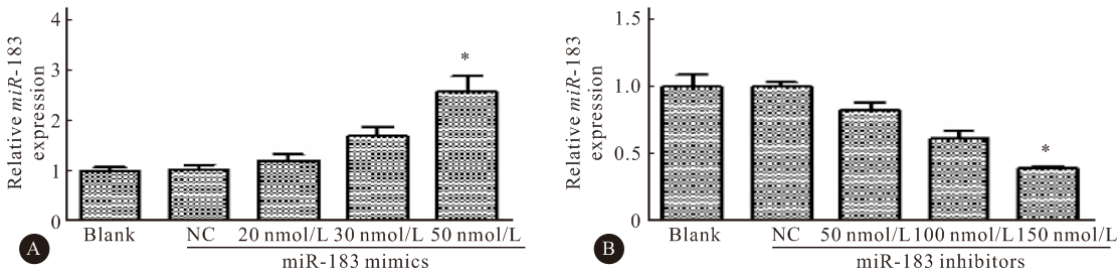


图 1 转染不同浓度 miR-183 mimics 和 inhibitors 后细胞 miR-183 基因的表达

Fig 1 qPCR analysis of the expression levels of miR-183 in cells transfected with miR-183 mimics (A) or inhibitors (B)

* $P < 0.05$, vs. other groups

50 nmol/L、miR-183 inhibitor 150 nmol/L 进行。

2.2 SW1990 胰腺癌细胞转染后 PDCD4 基因和蛋白的表达

SW1990 胰腺癌细胞分别转染 50 nmol/L mimic 和 150 nmol/L inhibitor 后 48 h,qPCR 和 Western blot 检测结果显示,miR-183 mimics 能下调 PDCD4 mRNA 和蛋白的表达,而 miR-183 inhibitor 能上调 PDCD4 mRNA 和蛋白的表达(P 均 < 0.05),见图 2 和图 3。

2.3 MiR-183 对细胞增殖的影响

MTT 法检测结果显示,应用 150 nmol/L miR-183 inhibitors 作用细胞 48、72 h 后,SW1990 细胞的抑制率分别达到 16.41% 和 25.50%,与两个对

照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

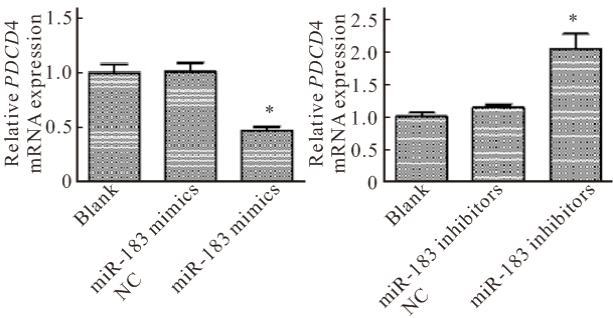


图 2 qPCR 检测 PDCD4 mRNA 的表达

Fig 2 qPCR analysis showed the decrease in PDCD4 mRNA expression treated with the miR-183 mimics or the increase treated with the miR-183 inhibitors

* $P < 0.05$, vs. other groups

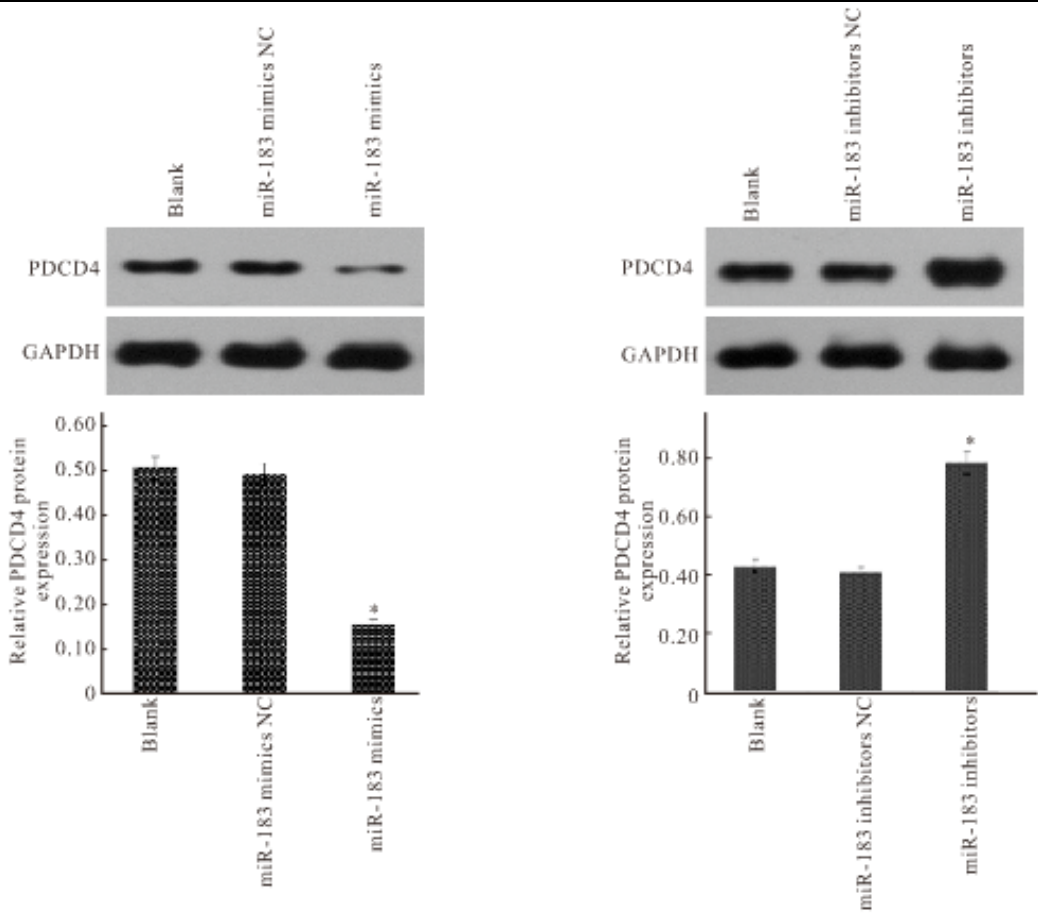


图 3 Western blot 检测 PDCD4 蛋白的表达

Fig 3 Western blot showed expression of PDCD4 was decreased by miR-183 mimics or increased by miR-183 inhibitors

* $P<0.05$, vs. other groups

表 1 MTT 检测 miR-183 inhibitors 对 SW1990 胰腺癌细胞增殖抑制率的影响

Table 1 The inhibition rate of cell proliferation by anti-miR183 treatment, demonstrated by the MTT assay

Group	Inhibition rate/%		
	24 h	48 h	72 h
Blank	0	0	0
miR-183 inhibitors NC	0.79	0.38	0.50
miR-183 inhibitors	1.19	16.41*	25.50*

* $P<0.05$, vs. other groups at the same time point

2.4 细胞凋亡和周期检测

Annexin-V FITC/PI 法检测结果(图 4)显示, 150 nmol/L miR-183 inhibitor 处理细胞 48 h 后, 凋亡率达 $16.74\% \pm 1.58\%$, 与两个对照组比较, 差异有统计学意义($P<0.01$), Hoechst 染色(图 5)也提示 miR-183 inhibitors 组细胞凋亡率升高($P<0.01$)。PI 单染法测细胞周期, 发现 miR-183 inhibitors 可以使胰腺癌细胞阻滞于 G_0/G_1 期($P<$

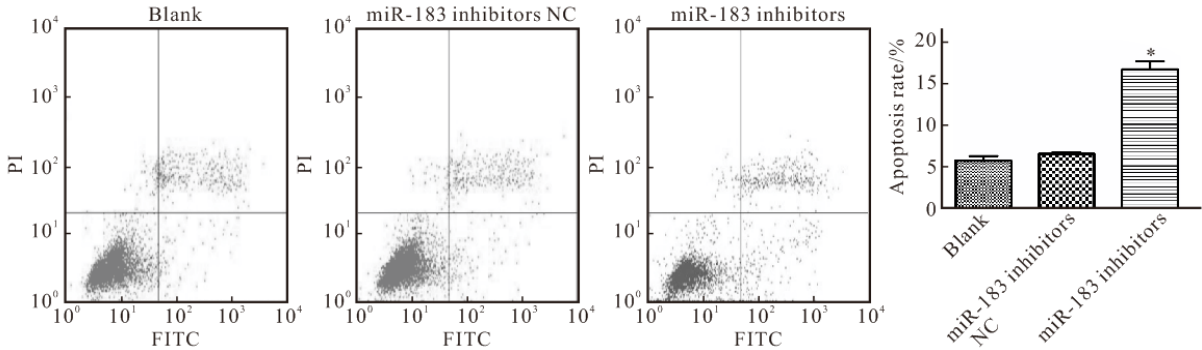


图 4 Annexin V FITC/PI 双染法检测 SW1990 胰腺癌细胞凋亡

Fig 4 Induction of apoptosis in the SW1990 cell line. Significant apoptosis was observed in the miR-183 inhibitors group, when analyzed by flow cytometry

* $P<0.01$, vs. other groups

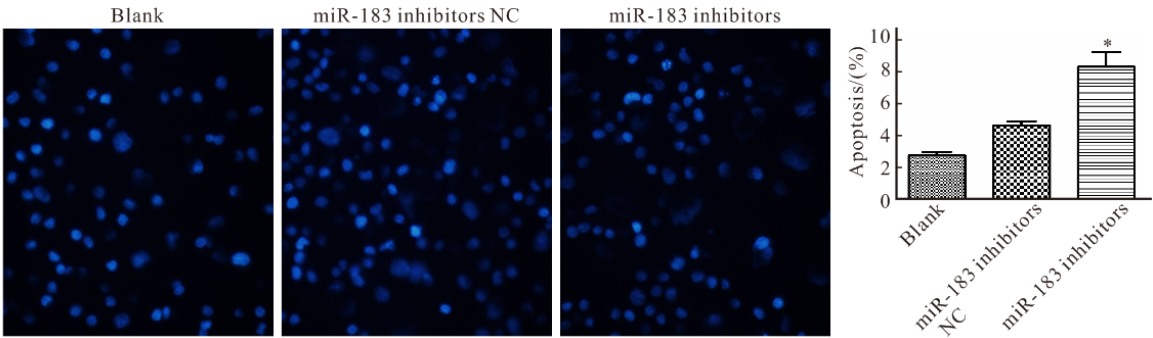


图 5 Hoechst33258 染色检测 SW1990 胰腺癌细胞凋亡。×400

Fig 5 Induction of apoptosis in the SW1990 cell line. Significant apoptosis was observed in the miR-183 inhibitors group, when analyzed by Hoechst33258 staining. ×400

* $P<0.01$, vs. other groups

0.05), 见表 2。

2.5 细胞 bcl-2 蛋白的表达

SW1990 胰腺癌细胞经 150 nmol/L miR183 inhibitor 处理后 48 h, Western blot 检测结果显示, miR-183 inhibitors 能下调 bcl-2 的表达 ($P<0.05$) (图 6)。

表 2 MiR-183 inhibitors 对 SW1990 胰腺癌细胞周期的影响

Table 2 Cell cycle analysis

Group	G ₁ /%	S/%	G ₂ /%
Blank	49.12±0.25	40.04±1.27	10.83±1.31
miR-183 inhibitors NC	48.87±0.48	40.22±0.78	10.91±0.84
miR-183 inhibitors	52.93±1.89 *	40.50±1.05	6.56±0.98 *

* $P<0.05$, vs. other groups

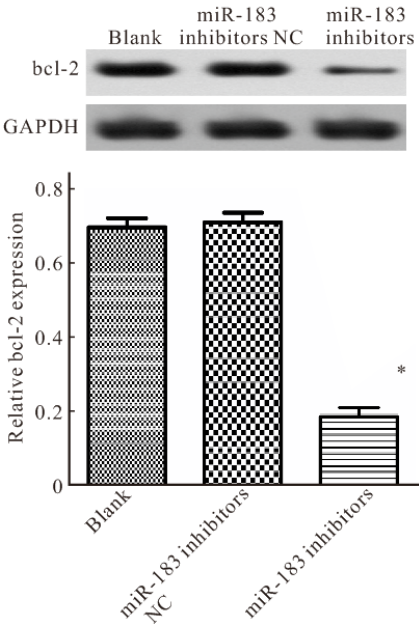


图 6 Western blot 检测细胞 bcl-2 蛋白表达

Fig 6 Western blot showed expression of bcl-2 was decreased by miR-183 inhibitors

* $P<0.05$, vs. other groups

3 讨论

MiR-183 家族包括了定位于 7 号染色体(7q31-34)的 miR-183、miR-182、miR-96 三种 miRNA, 在进化上具有高度的保守性^[5]。研究发现, 人类多种肿瘤中存在 miR-183 家族成员的异常表达, 通过调控肿瘤细胞分裂与凋亡的相关基因参与肿瘤发生、发展的过程。WANG 等^[6]研究发现 miR-183 可能作为转移抑制因子作用于 VIL2 编码的 Ezrin 蛋白, 使肺癌细胞的转移和侵袭能力下降, 同样的结果也存在于乳腺癌中^[4]。在结肠癌相关研究中, SARVER 等^[7]发现 miR-183 在结肠癌中有调节早期生长反应基因 1(EGR1)和人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力酶同源的基因(PTEN)的作用, 并与结肠肿瘤转移有关。miRNA 在胰腺癌中的表达异常也与肿瘤生物学特性密切相关, YU 等^[8]利用芯片技术检测了胰腺导管上皮内瘤变组织(胰腺癌癌前病变)的 miRNA 表达, 发现了包括 miR-183 在内的许多 miRNA 表达上调, 但迄今为止, miR-183 在胰腺癌发生中的作用及其具体机制尚不清楚。本研究初步探讨了 miR-183 体外对胰腺癌细胞的生长、增殖、凋亡及细胞周期的影响, 以及探索 miR-183 是否通过调控下游基因 PDCD4 而发挥调节作用。结果发现: SW1990 胰腺癌细胞转染 miR-183 inhibitors 后, MTT 法显示细胞生长明显受到抑制; 进一步通过 Annexin-V FITC/PI/Hoechst 染色及流式细胞术检测发现: 转染 miR-183 inhibitors 的 SW1990 胰腺癌细胞凋亡率明显上升, 且细胞停滞于 G₀/G₁ 期的比例增加, 提示 miR-183 可能与胰腺癌的发生发展有关, 拮抗 miR-183 治疗可能通过促进细胞凋亡在胰腺癌中发挥抑癌的作用。

PDCD4 基因序列编码 485 个氨基酸,既往有研究发现,*PDCD4* 在细胞凋亡过程中表达增加,而在多种人肿瘤组织细胞中表达缺失或低表达^[9-11]。越来越多的研究表明 *PDCD4* 可调节多种信号通路,抑制相关基因的转录和翻译而抑制肿瘤生成,因此被认为是一种新的抑癌基因。LI 等^[12]研究发现,miR-183 可以通过下调 *PDCD4* 抑制 TGF- β 1 介导的细胞凋亡,提示 *PDCD4* 可能是 miR-183 的下游靶基因。YANG 等^[13]发现食管癌中 miR-183 通过靶向 *PDCD4* 基因促进肿瘤生长。国内也有学者通过蛋白质印迹和免疫组化法证实 *PDCD4* 在胃结肠等消化系肿瘤、包括胰腺癌组织中的表达降低,且与肿瘤分化程度密切相关^[14]。基于 miR-183 靶向结合于 *PDCD4* mRNA 的 3'-非翻译区而受到 miR-183 调控,本研究通过体外胰腺癌细胞实验探讨了 miR-183 和 *PDCD4* 的关系,结果发现:转染了 miR-183 mimics 后,不管在 mRNA 还是蛋白水平,*PDCD4* 表达均下调,而转染了 miR-183 inhibitors 后,*PDCD4* 表达均上调。*BCL* 家族在细胞凋亡中起重要作用,*bcl-2* 是抗凋亡基因,与细胞学实验类似,我们发现 miR-183 inhibitors 能明显下调 *bcl-2* 蛋白的表达水平,从而促进了胰腺癌细胞的凋亡。

总之,本研究证实了 miR-183 可能在胰腺癌发生中扮演了促癌的角色,拮抗 miR-183 可抑制胰腺癌细胞增殖、促进细胞凋亡、阻滞细胞周期,并可能通过靶向 *PDCD4* 基因发挥调控胰腺癌发生发展的作用,相信随着这类基因 miRNA 分子机制的逐步深入研究,有望为胰腺癌提供新的治疗靶点。

参 考 文 献

- [1] BARON TH, KOZAREKR A. Preoperative biliary stents in pancreatic cancer-proceed with caution. *N Engl J Med*, 2010, 362(2):170-172.
- [2] TIE J, FAN D. Big roles of microRNAs in tumorigenesis and tumor development. *Histol Histopathol*, 2011, 26(10):1353-1361.
- [3] CHOU J, SHAHI P, WERB Z. microRNA-mediated regulation of the tumor microenvironment. *Cell Cycle*, 2013, 12(20):3262-3271.
- [4] LOWERY AJ, MILLER N, DWYER RM, *et al.* Dysregulated miR-183 inhibits migration in breast cancer cells. *BMC Cancer*, 2010(10):502. doi: 10.1186/1471-2407-10-502.
- [5] PIERCE ML, WESTON MD, FRITZSCH B, *et al.* MicroRNA-183 family conservation and ciliated neurosensory organ expression. *Evol Dev*, 2008, 10(1):106-113.
- [6] WANG G, MAO W, ZHENG S. MicroRNA-183 regulates Ezrin expression in lung cancer cells. *FEBS Lett*, 2008, 582(25/26):3663-3668.
- [7] SARVER AL, LI L, SUBRAMANIAN S. MicroRNA miR-183 functions as an oncogene by targeting the transcription factor EGR1 and promoting tumor cell migration. *Cancer Res*, 2010, 70(23):9570-9580.
- [8] YU J, LI A, HONG SM, *et al.* MicroRNA alterations of pancreatic intraepithelial neoplasias. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(4):981-992.
- [9] JANSEN AP, CAMALIER CE, COLBURN NH. Epidermal expression of the translation inhibitor programmed cell death 4 suppresses tumorigenesis. *Cancer Res*, 2005, 65(14):6034-6041.
- [10] LANKAT-BUTTGEREIT B, GOKE R. The tumour suppressor Pcd4: recent advances in the elucidation of function and regulation. *Biol Cell*, 2009, 101(6):309-317.
- [11] SCHMID T, JANSEN AP, BAKER AR, *et al.* Translation inhibitor Pcd4 is targeted for degradation during tumor promotion. *Cancer Res*, 2008, 68(5):1254-1260.
- [12] LI J, FU H, XU C, *et al.* MiR-183 inhibits TGF-beta1-induced apoptosis by downregulation of *PDCD4* expression in human hepatocellular carcinoma cells. *BMC Cancer*, 2010(10):354. doi: 10.1186/1471-2407-10-354.
- [13] YANG M, LIU R, LI X, *et al.* miRNA-183 suppresses apoptosis and promotes proliferation in esophageal cancer by targeting *PDCD4*. *Mol Cells*, 2014, 37(12):873-880.
- [14] 马 刚, 张 浩, 董 明, 等. 程序性细胞死亡因子 4 在消化系统肿瘤中表达及其与肿瘤分化的关系. *中华肿瘤防治杂志*, 2007, 14(4):249-253.

(2016-01-20 收稿, 2016-05-23 修回)

编辑 沈 进