

# miRNA-10b 靶向 HOXD10 促进胰腺癌细胞侵袭及迁移的机制研究

余伟 宋政炜 王晓光 秦红波 钟征翔 费建国

**[摘要]** 目的 研究 miRNA-10b 在胰腺癌细胞 PANC-1 侵袭及迁移过程中的作用及作用机制。方法 将化学合成外源性 miRNA-10b 模拟体瞬时转染至胰腺癌细胞 PANC-1 后,采用 Transwell 小室和细胞划痕实验检测 PANC-1 侵袭及迁移功能的影响,生物信息学分析 miRNA-10b 的靶基因,采用 Western blot 法检测靶基因 HOXD10 蛋白表达情况。结果 miRNA-10b 瞬时转染 PANC-1 后,转染组中的 miRNA-10b 表达量明显高于阴性对照组( $t=17.40, P<0.05$ ),转染成功。转染组 PANC-1 细胞穿膜数明显多于阴性对照和空白对照组,划痕间距较阴性对照和空白对照组缩小明显,Western blot 显示转染组中 HOXD10 蛋白表达量较阴性对照和空白对照组下降明显。结论 miRNA-10b 靶向抑制 HOXD10 表达发挥生物学作用,促进胰腺癌细胞的侵袭及迁移。

**[关键词]** 胰腺癌细胞; miRNA-10b; HOXD10; 侵袭; 迁移

**miRNA-10b promotes invasion and migration of pancreatic carcinoma cells through targeting HOXD10** YU Wei, SONG Zhengwei, WANG Xiaoguang, et al. Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Hospital of Jiaxing, Jiaxing 314000, China.

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect and mechanism of miRNA-10b on the invasion and migration of pancreatic carcinoma PANC-1 cells. **Methods** The synthesized exogenous miRNA-10b mimics was transferred into PANC-1 cells via lipofectamine-2000. The invasion of PANC-1 cells was investigated by Transwell chamber assay, the migration of PANC-1 cells was detected by cell scratch assay, the target gene of miRNA-10b was screened by bioinformatics analysis and expression of HOXD10 was detected by Western blot. **Results** After the transfection of PANC-1 with miRNA-10b, the expression of miRNA-10b in mimics group was significantly higher than that of the negative control group ( $t=17.40, P<0.05$ ). Transwell chamber assay showed that the numbers of cells permeating septum in mimics group were more than the other two groups obviously. Cell scratch assay pointed out that the nick space of mimics group was narrower than the other two groups. Western blot showed that the expression of HOXD10 protein in mimics group was significantly decreased when comparing with the other two groups. **Conclusion** miRNA-10b plays a biological role in promoting the invasion and migration of pancreatic cancer cells through targeting inhibit HOXD10 expression.

**[Key words]** pancreatic carcinoma cells; miRNA-10b; HOXD10; invasion; migration

胰腺癌大多是源于胰腺导管上皮的恶性肿瘤,恶性程度高,早期即可出现局部浸润和远处转移<sup>[1]</sup>。约 80% 的患者在诊断时即处于中、晚期<sup>[2]</sup>,总体 5 年生存率低于 5%<sup>[3]</sup>。目前手术是唯一可能治愈的方法,但真正适合根治性切除的患者不到 10%<sup>[4]</sup>。研

究发现,胰腺癌患者死亡的主要原因是肿瘤转移及早期复发。故寻找胰腺癌转移相关的肿瘤标志物和治疗靶分子,进一步明确转移相关的生物学机制是目前胰腺癌研究的重点。

miRNA 是一类内源性高度保守的非编码 RNA,通过与靶基因 mRNA 的配对,在转录后水平产生基因沉默,在肿瘤的发生发展中扮演重要角色<sup>[5]</sup>。miRNA-10b 在肝癌、胃癌、乳腺癌等多种肿瘤组织中有异常表达,并且与肿瘤的侵袭和转移密切相

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2020.002.006

基金项目:嘉兴市科技计划项目(2017BY18013)

作者单位:314000 浙江嘉兴,嘉兴市第二医院肝胆外科

通讯作者:费建国,Email:Jianguofei@163.com

关<sup>[6]</sup>。Bloomston等<sup>[7]</sup>也曾报道 miRNA-10b 在胰腺癌组织中高表达。肿瘤的侵袭及转移与 miRNA-10b 的关系密切,可能与其靶基因受到调控有关。本研究拟通过合成外源性 miRNA-10b 瞬时转染入胰腺癌细胞 PANC-1 中,进而检测 miRNA-10b 对胰腺癌细胞 PANC-1 侵袭及迁移的作用,并对其靶基因等作用机制进一步探讨。

## 1 材料与方 法

1.1 细胞株和主要试剂 胰腺癌细胞 PANC-1 由中科院上海细胞研究所引进,Trizol 试剂由 Invitrogen 公司生产,实时荧光定量 PCR 试剂盒由 Takara 公司生产,miRNA-10b 逆转录及上下游引物、内参 U6、外源性 miRNA-10b 模拟体和无关序列(NC)由广州锐博公司合成,脂质体-2000 由 Invitrogen 公司生产,Transwell 小室由美国 Millipore 公司生产,Matrigel 由美国 BD 公司生产,HOXD10 一抗由美国 Abcam 公司生产, $\alpha$ -tubulin 由 CST 公司生产。本次研究开展时间为 2017 年 12 月至 2018 年 11 月。

1.2 生物信息学分析 通过文献检索,采用 TargetScan、picTar 和 miRanda 3 种生物学软件分析 miRNA-10b 可能调控的靶基因,选取 HOXD10 为目标靶基因。

## 1.3 方 法

1.3.1 细胞培养 PANC-1 细胞采用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基,在 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 条件下培养,待细胞处于对数生长期时进行实验。

1.3.2 细胞转染 本次研究设置三组,miRNA-10b 转染组:加入 miRNA-10b 模拟体、脂质体-2000 和 OPTI-MEM I 培养基;阴性对照组:加入无关序列(NC)、脂质体 2 000 和 OPTI-MEM I 培养基;空白对照组:仅加入脂质体-2000 和 OPTI-MEM I 培养基。转染前一天取  $2 \times 10^5$  个细胞接种于 6 孔板内,待细胞生长至 50% 融合度时进行转染。取外源性 miRNA-10b/ NC、脂质体-2000 5  $\mu$ l,分别加入 OPTI-MEM I 稀释至 250  $\mu$ l,两者混合静置后加入 PANC-1 细胞中。转染 6 h 后,换含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基继续培养。

1.3.3 实时荧光定量 PCR 培养三组细胞至对数生长期时,Trizol 分别提取总 RNA,验证浓度及纯度后用 miRNA-10b 的上下游引物及 SYBR Green I 荧光染料进行 PCR 检测,所用内参为 U6。取平均值进行计算。结果分析采用相对定量的比较 Ct 法,即  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法。计算 miRNA-10b 在转染组中相对于空白

对照组中的表达量。miRNA-10b 上游引物序列:5'-ACATCATACCCTGTAGAACCGAA-3',下游引物序列:5'-GATTGGATGTTCTCCACAGTCTC-3'; U6 上游引物序列:5'-ATTGGAACGATACAGAGAA-GATT-3',下游引物序列:5'-GGAACGCTTCAC-GAATTTG-3'。实验重复 3 次。

1.3.4 Transwell 小室检测细胞侵袭 向 Transwell 小室中加入 100  $\mu$ l 无血清 RPMI1640 培养基稀释的 Matrigel,37 °C 包被 1 h。转染 36 h 后消化离心 PANC-1 细胞,然后用无血清 RPMI1640 培养基重悬至  $5 \times 10^5$ /ml,向底部小室加入含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液,上部小室加入 100  $\mu$ l 细胞悬液,常规培养 24 h。处理:4% 多聚甲醛 1 ml 室温下 2 min,无水甲醇 1 ml 室温下 20 min,1 ml Giemsa 染液室温下避光 15 min。擦去小室底部内表面的细胞,正置载玻片上,200 倍光镜下随机取 5 个视野计数穿膜细胞数量。实验重复 3 次。

1.3.5 细胞划痕实验检测细胞迁移 转染后 36 h,消化收集重悬细胞,将细胞浓度稀释至  $5 \times 10^5$  个/孔接种至 6 孔板中常规培养,待细胞融合度生长至 90% 时,用 20  $\mu$ l 枪头在 6 孔板底部划垂直线,磷酸盐缓冲液洗涤后加入无血清培养基常规培养。0 h、24 h、48 h 取样拍照。实验重复 3 次。

1.3.6 Western blot 法检测 HOXD10 蛋白表达 转染 48 h 后,收集三组细胞,用细胞组织快速裂解液裂解细胞,提取细胞总蛋白,测定蛋白浓度,加入  $1 \times$  上样缓冲液后变性蛋白。配制 10% SDS-PAGE,每孔加入 20  $\mu$ g 蛋白样品。使用湿转法电转至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,1:1 000 TBST 稀释一抗,4 °C 过夜;加入羊抗兔二抗 1:5 000 稀释,室温孵育 2 h;增强化学发光。以  $\alpha$ -tubulin 作为内参。相对表达量以 HOXD10 与  $\alpha$ -tubulin 灰度扫描值的比值表示。实验重复 3 次。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件进行处理,计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组组间差异采用 *t* 检验。设  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

2.1 转染 miRNA-10b 后,三组细胞中 miRNA-10b 的相对表达量比较 以空白对照组为基线,miRNA-10b 在转染组中的相对表达量为  $4.39 \pm 0.18$ ,阴性对照组中 miRNA-10b 的相对表达量为  $1.18 \pm 0.11$ ,两组比较,差异有统计学意义( $t=17.40, P < 0.05$ )。

2.2 三组 PANC-1 细胞侵袭能力见封三图 3

由封三图3可见,miRNA-10b转染组PANC-1细胞穿膜数明显多于阴性对照组和空白对照组。

### 2.3 三组PANC-1细胞的迁移能力见封三图4

由封三图4可见,0~48 h miRNA-10b转染组的划痕间距逐渐缩小,而阴性对照组和空白对照组划痕间距均无明显变化。

### 2.4 转染miRNA-10b后,三组PANC-1细胞中HOXD10蛋白表达量见图1

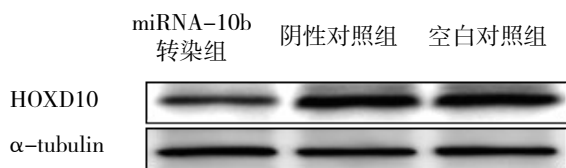


图1 转染后三组细胞中HOXD10蛋白量的表达

由图1可见,HOXD10蛋白在miRNA-10b转染组中的表达量明显低于阴性对照组和空白对照组,而阴性对照组和空白对照组的HOXD10蛋白表达量没有明显差异。

## 3 讨论

miRNA作为非编码RNA,其作用机制主要是在转录后水平产生基因沉默,在细胞分化、增殖、凋亡、代谢等诸多调节过程中发挥重要作用<sup>[8]</sup>。研究表明超过半数的miRNAs编码序列定位于肿瘤相关基因的基因组内,提示miRNAs在肿瘤的发生和发展过程中起重要作用<sup>[9]</sup>。miRNA在许多肿瘤的发生发展中起到类似癌基因或抑癌基因的作用,从而参与了人类肿瘤形成的多条信号通路。不同的miRNAs可以作为肿瘤早期诊断、治疗及判断预后的分子标志物。

miRNA-10b定位于2号染色体的HOXD4与HOXD8基因之间,在肿瘤内的表达及生物学作用逐渐被研究人员重视,其主要与肿瘤的侵袭和转移等一系列恶性生物学行为相关。研究表明miRNA-10b可能作为癌基因,对肿瘤发生、发展起促进作用,而其靶基因,目前尚未完全明确。HOXD10基因亦位于2号染色体,属于同源盒子家族中一种,是细胞分化、个体生长发育和肿瘤侵袭及转移的关键基因位点,受到miRNA-10b及其他多种负性调控作用,在多数恶性肿瘤表达缺失。目前HOXD10基因与肿瘤的关系研究,主要集中在乳腺癌、肝癌、食道癌、胶质瘤等方面,与胰腺癌相关的研究较少<sup>[10]</sup>。

侵袭和迁移是胰腺癌的恶性生物学行为之一,也是胰腺癌之所以成为“癌中之王”的重要促成条件<sup>[11]</sup>。本实验采用瞬时转染方法,提高了miRNA-

10b在转染细胞PANC-1细胞中的表达量,从而PANC-1细胞的侵袭和迁移能力显著增强,这一发现可能揭示了胰腺癌患者病情进展迅速,早期出现局部浸润和转移的重要机制。通过本次Western blot实验发现,HOXD10蛋白表达量在转染组中明显降低,其可能作为miRNA-10b抑制的靶基因发挥促癌作用。此外,有关HOXD10与下游信号通路的研究,目前在其他肿瘤中火热的开展中。在肝癌、卵巢癌及膀胱癌中,已发现了Rho/ROCK等与肿瘤细胞迁移、侵袭密切相关的信号分子<sup>[12,13]</sup>,但在胰腺癌中,是否存在miRNA-10b靶向抑制HOXD10,从而激活RhoC/ROCK-1通路或其他信号通路促进胰腺癌侵袭和转移的机制,需要接下来进一步深入研究。目前胰腺癌治愈困难,主要原因是侵袭生长和远处转移,由于miRNA-10b能促进胰腺癌细胞侵袭和转移,因此,利用反义寡核苷酸技术来抑制miRNA-10b的表达水平或使miRNA-10b/HOXD10信号通路的失调,有望成为胰腺癌治疗的新靶点之一<sup>[14]</sup>,但促进胰腺癌进展的miRNAs众多,相互之间可能存在错综复杂的网络关系和通路,因此,联合多个miRNAs的反义多聚核苷酸技术靶向治疗胰腺癌,在未来可期。

## 参考文献

- 1 Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- 2 Vincent A, Herman J, Schulick R, et al. Pancreatic cancer [J]. Lancet, 2011, 378(9791): 607-620.
- 3 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(1): 5-29.
- 4 Ferrone CR, Brennan MF, Gonen M, et al. Pancreatic adenocarcinoma: the actual 5-year survivors [J]. J Gastrointest Surg, 2008, 12(4): 701-706.
- 5 Anokye-Danso F, Trivedi C, Juhr D, et al. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency [J]. Cell Stem Cell, 2012, 8(4): 376-388.
- 6 钟玉祥, 刘宁. Has-miR-10b与肿瘤侵袭性关系的研究进展 [J]. 肿瘤医学, 2010, 16(10): 1476-1479.
- 7 Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, et al. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis [J]. Am Med Assoc, 2007, 29(17): 1901-1908.
- 8 Vivacqua A, De Marco P, Belfiore A, et al. Recent advances on the role of microRNAs in both insulin resis-

- tance and cancer[J]. *Curr Pharm Des*, 2017, 23 (25) : 3685-3666.
- 9 Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15(6):321-333.
- 10 Nakayama I, Shibasaki M, Yashima-Abo A, et al. Loss of HOXD10 expression induced by upregulation of miR-10b accelerates the migration and invasion activities of ovarian cancer cells[J]. *Int J Oncol*, 2013, 43(1): 63-71.
- 11 赵欣, 尤胜义. miRNA 在胰腺癌发生、发展及临床应用中的研究进展[J]. *山东医药*, 2015, 55(24): 101-103.
- 12 Sun K, Duan X, Cai H, et al. Curcumin inhibits LPA-induced invasion by attenuating RhoA/ROCK/MMPs pathway in MCF7 breast cancer cells[J]. *Clin Exp Med*, 2016, 16(1):37-47.
- 13 Jiang L, Wen J, Luo W. Rho-associated kinase inhibitor, Y-27632, inhibits the invasion and proliferation of T24 and 5367 bladder cancer cells[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12 (5):7526-7530.
- 14 Kasinski AL, Slack FJ. Epigenetics and genetics. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(12):849-864.

(收稿日期 2019-07-20)

(本文编辑 蔡华波)

(上接第116页)

- 3 Dong XQ, Zhang YH, Shang XQ, et al. Effects of miR-101 on the proliferation and apoptosis of gastric mucosal epithelial cells via Nrf2/ARE signaling pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(12):5187-5194.
- 4 Wang L, Bo X, Zheng Q, et al. miR-296 inhibits proliferation and induces apoptosis by targeting FGFR1 in human hepatocellular carcinoma[J]. *FEBS Lett*, 2016, 590 (23):4252-4262.
- 5 Lee KH, Lin FC, Hsu TI, et al. MicroRNA-296-5p (miR-296-5p) functions as a tumor suppressor in prostate cancer by directly targeting Pin1[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843(9):2055-2066.
- 6 Wang Y, Chen JQ, Chen ZY. Deregulated miR-296 / S100A4 axis promotes tumor invasion by inducing epithelial-mesenchymal transition in human ovarian cancer [J]. *Am J Cancer Res*, 2016, 6(2):260-269.
- 7 Chew-Wun Wu, Chao AHsiung, Su-ShunLo, et al. Nodal dissection for patients with gastric cancer: a randomised controlled trial[J]. *Lancet Oncol*, 2006, 7(4):309-315.
- 8 Guo XF, Liu JP, Ma SQ, et al. Avicularin reversed multi-drug-resistance in human gastric cancer through enhancing Bax and BOK expressions[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 103:67-74.
- 9 Llambi F, Wang YM, Victor B, et al. BOK is a non-canonical BCL-2 family effector of apoptosis regulated by er-associated degradation[J]. *Cell*, 2016, 165(2):421-433.
- 10 David PB. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions[J]. *Cell*, 2009, 136(2):215-233.
- 11 Xu JF, Wang FR, Wang X, et al. miRNA-543 promotes cell migration and invasion by targeting SPOP in gastric cancer[J]. *Oncotargets Ther*, 2018, 11:5075-5082.
- 12 Hu XY, Miao JY, Zhang M, et al. miRNA-103a-3p promotes human gastric cancer cell proliferation by targeting and Suppressing ATF7 in vitro[J]. *Mol Cells*, 2018, 41 (5):390-400.
- 13 Zheng LD, Chen YJ, Lin Y, et al. miRNA-584-3p inhibits gastric cancer progression by repressing Yin Yang 1-facilitated MMP-14 expression[J]. *Sci Rep*, 2017, 7:8967.
- 14 Wang ZZ, Luo YR, Du J, et al. MiR-296-5p inhibits cell invasion and migration of esophageal squamous cell carcinoma by downregulating STAT3 signaling[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(12):5206-5214.
- 15 Li T, Lu YY, Zhao XD, et al. MicroRNA-296-5p increases proliferation in gastric cancer through repression of caudal-related homeobox 1[J]. *Oncogene*, 2014, 33 (6) : 783-793.

(收稿日期 2019-08-13)

(本文编辑 蔡华波)