

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2013.08.002

• 基础研究 •

miR-375 和 PDK1 在胰腺癌组织中的表达及两者的相关性

宋世铎, 周 健, 何宋兵, 李德春

Correlation between miR-375 and PDK1 Expression in Pancreatic Cancer Tissues

SONG Shiduo, ZHOU Jian, HE Songbing, LI Dechun

Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China

Corresponding Author: LI Dechun, E-mail: dechunli@126.com

Abstract: Objective To investigate the expression of microRNA-375 (miR-375) and 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) in pancreatic cancer and analyze their correlation. **Methods** miR-375 and PDK1 expression in pancreatic tissues and cell lines were evaluated using quantitative real-time PCR (qRT-PCR). After transfecting miR-375 mimics into Panc-1 cells, the expression of PDK1 mRNA and protein were assessed by qRT-PCR and Western blotting, respectively. **Results** Significant downregulation of miR-375 in pancreatic cancer and Panc-1 cells was identified, whereas PDK1 was upregulated in these samples. Transfection of miR-375 mimics led to downregulation of PDK1 in Panc-1 cells. **Conclusion** miR-375 may be a tumor suppressor in pancreatic cancer and regulate PDK1 negatively.

Key words: Pancreatic cancer; miR-375; PDK1

摘要:目的 探讨 miR-375 与 PDK1 在胰腺癌中的表达及两者的相关性。**方法** qRT-PCR 方法检测胰腺癌组织及胰腺癌细胞系中 miR-375、PDK1 表达,转染 miR-375 模拟物上调其在 Panc-1 中的表达,检测转染后 Panc-1 中 PDK1 表达变化。**结果** miR-375 在人胰腺癌组织中表达下调,在 Panc-1 中表达较 HEK293 明显降低。PDK1 在胰腺癌组织中表达上调,在 Panc-1 中表达较 HEK293 明显增高。转染 miR-375 模拟物上调 Panc-1 中 miR-375 表达后,转染组 PDK1 表达较空白组和阴性对照组均明显下降。**结论** miR-375 在胰腺癌中发挥抑癌基因作用,对 PDK1 具有负调控作用。

关键词: 胰腺癌; miR-375; PDK1

中图分类号: R735.9 **文献标识码:** A

0 引言

进入 21 世纪,我国胰腺癌的发病率逐年上升,尤其在大城市中,发病率上升明显^[1]。胰腺癌已成为我国人口死亡的十大恶性肿瘤之一^[2],在肿瘤相关疾病导致死亡中位居第六位^[3]。在美国,由癌症导致死亡的所有疾病中,胰腺癌高居第四位。2011 年,美国胰腺癌的新发病例为 43 920 人,估计约 33 390 人死于胰腺癌,每年发病人数和死亡人数几乎相等^[4]。因此,发现一种特有的、可用于早期诊断的标志物和靶向分子,对于战胜胰腺癌具有重要意义。

miRNA 是近来发现的一种内源性非编码小 RNA,包含约 22 个核苷酸,它可在转录后水平下调 mRNA 的表达水平而得到人们关注。miRNA 在细胞周期的关键进程中调节蛋白的表达,例如分化、增殖和凋亡^[5-6]。PI3K/PKB 细胞生存信号通路与肿瘤的形成密切相关,而 PDK1 作为关键的 PKB 上游激活因子,与肿瘤之间也存在着密切的关系。本研究旨在通过检测胰腺癌组织及细胞株中 miR-375 和 PDK1 的表达,探讨两者相关性及其在胰腺癌中可能发挥的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

收集 2008 年 1 月—2011 年 3 月在苏州大学附属第一医院普外科接受手术治疗的胰腺癌临床标本,经术后病理确诊为胰腺癌的组织学标本共 44 例,术前均未行放疗、化疗等。人胰腺癌细胞系

收稿日期:2012-07-02;修回日期:2012-09-18

基金项目:国家自然科学基金青年项目资助课题(81201905)

作者单位:215006 江苏苏州,苏州大学附属第一医院普通外科

通信作者:李德春, E-mail: dechunli@126.com

作者简介:宋世铎(1982-),男,硕士,主治医师,主要从事胰腺疾病的基础与临床研究

Panc-1 购自上海吉凯基因化学技术有限公司, SW1990、Patu8988 和 HEK293 均由江苏省血液研究所提供。高糖 DMEM 培养液、RPMI 1640 培养液购自 Hyclone 公司、胎牛血清(FBS)购自杭州四季青生物制品公司。RNA 抽提试剂 Trizol、反转录试剂盒 TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit、实时荧光定量 PCR 试剂盒 TaqMan 2 × Universal PCR Master Mix、Lipofectamine™2000 购自美国 Invitrogen 公司。Opti-MEM 稀释液购自 Gibco 公司。pre-has-miR375、miR-375-NC 购自上海吉凯基因化学技术有限公司。PDK1 引物购自生工生物工程(上海)有限公司。PDK1 一抗购自 Santa Cruz 公司。

1.2 细胞培养

Panc-1 细胞用高糖 DMEM 培养液(含有 10% FBS), SW1990、Patu8988 和 HEK293 细胞用 RPMI 1640 培养液(含有 10% FBS), 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养。

1.3 细胞转染

本实验选择 3 株细胞株中 miR-375 表达水平最低的 Panc-1 细胞进行转染, 转染按照 Lipofectamine™2000 转染试剂说明书进行。取对数生长期细胞, 调整细胞密度为每毫升 1×10^5 个细胞。转染前一天, 以 5×10^5 个 Panc-1 接种到 6 孔培养板上。转染时, 细胞要达到 80% 的融合。240 μ l Opti-MEM 与 10 μ l Lipofectamine™2000 (总体积 250 μ l) 混合, 室温孵育 5 min; 4 μ g 质粒加入 Opti-MEM 中, 总体积调整至 250 μ l; 将两种溶液混合, 总体积 500 μ l, 室温下置 20 min。与此同时, 将 6 孔板中的细胞用无血清培养液冲洗细胞两遍后, 将混合液逐滴加入每孔中, 摇动培养板, 轻轻混匀。在培养箱中保温 5~6 h; 6 h 后, 更换含有血清的全培养液, 在培养箱中培养 24 h, 第二日加入含 1000 μ g/ml 的 G418 的培养液培养。有限稀释法挑选单克隆后继续培养。

1.4 实验分组

细胞分 3 组: 单纯转染试剂处理组(Control 组, 仅用 Lipofectamine™处理); 阴性对照组(miR-375-NC 组); 转染前体组(miR-375-mimics 组)。

1.5 qRT-PCR 检测 miR-375 的表达

按 Trizol 说明书提取细胞中的总 RNA。cDNA 的合成以 U6 作为内参, miR 375 反转录反应为 15 μ l 反应体系, 反应条件为: 16 °C 30 min, 42 °C 30 min, 85 °C 5 min, 4 °C 保存, 进行反转录反应。实时荧光定量 PCR 反应采用 20 μ l 反应体系, 反应条件为: 95 °C 10 min, 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40

个循环。所有反应均设 3 个复孔。采用定量 PCR 中的相对定量法(RQ, relative quantitative)表示 miRNA-375 的表达量。RQ = $2^{-\Delta\Delta CT}$, 其中 $\Delta CT = CT_{目的} - CT_{内参}$ 。

1.6 qRT-PCR 检测 PDK1 的表达

RNA 抽提同前。PDK1 上游引物 5'-GTG TAG ATT AGA GGG ATG-3', 下游引物 5'-AAG GAA TAG TGG GTT AGG-3', 扩增片段为 153 bp。β-actin 为内参, 上游引物 5'-CTC CAT CCT GGT CTC GCT GT-3', 下游引物 5'-GCT GTC ACC TTC ACC GTT CC-3', 扩增片段为 268 bp。PCR 反应条件: 94 °C 变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环, 72 °C 7 min, 4 °C 保存。

1.7 Western blot 检测 PDK1 蛋白表达

收集各实验组细胞, 分别提取总蛋白。用 Bradford 蛋白浓度试剂盒(碧云天)测定总蛋白浓度, 将定量后的蛋白质样品以每孔 20 μ g 点样于 SDS-PAGE 凝胶上样孔中, 200 V 电泳至溴酚蓝迁移到距分离胶底部 0.5 cm 处, 300 mA 转膜 70 min, 将转好的硝酸纤维素膜置于 5% 的脱脂奶粉中, 室温振荡封闭 2 h, 然后加入 1:400 PDK1 一抗, 4 °C 孵育过夜, TBS 缓冲液漂洗 3 次, 每次 10 min, 再加入二抗, 37 °C 于摇床孵育 1 h, TBS 缓冲液漂洗 3 次, 每次 10 min, 化学发光显影, 胶片曝光, 结果用 UVP 扫描仪扫描成像。内参 GAPDH 上游引物 5'-TGT TGC CAT CAA TGA CCC CTT-3', 下游引物 5'-CTC CAC GAC GTA CTC AGC G-3'。

1.8 统计学方法

实验数据的整理、分析使用 SPSS 17.0 统计软件, 实验数据采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 用一元方差(One-Way ANOVA)分析各组之间差异, 空白对照组与其余各组比较采用 LSD-t 检验, 组间两两比较采用 SNK-q 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-375 及 PDK1 在胰腺癌组织中的表达

QRT-PCR 结果显示 miR-375 在 44 例胰腺癌及癌旁组织中的表达量分别为 (0.413 ± 0.026) 和 (1.538 ± 0.061) , miR-375 在胰腺癌组织中表达较癌旁组织明显降低($P < 0.001$), 见图 1。QRT-PCR 结果显示 PDK1 mRNA 在 44 例胰腺癌及癌旁组织中的表达量分别为 (1.938 ± 0.085) 和 (0.771 ± 0.035) , PDK1 在胰腺癌组织中表达较癌旁组织明显增高($P < 0.05$), 见图 2。通过统计学 Spearman

相关性分析,发现两者呈明显负相关性($r = -0.0435, P < 0.01$)。

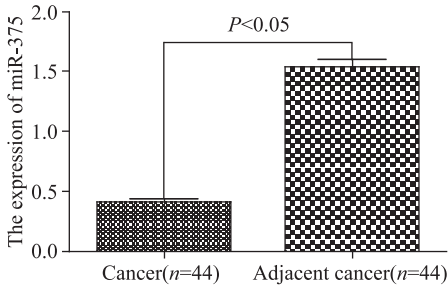


图 1 胰腺癌和癌旁组织中 miR-375 的相对表达量
Figure 1 The expression of miR-375 in pancreatic cancer tissues and adjacent cancer tissues

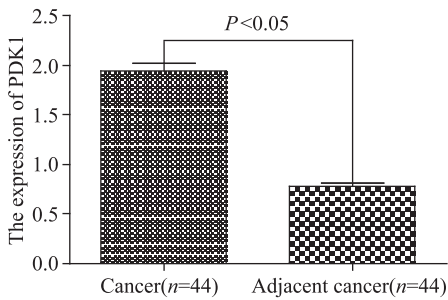


图 2 胰腺癌和癌旁组织中 PDK1 的相对表达量
Figure 2 The expression of PDK1 in pancreatic cancer tissues and adjacent cancer tissues

2.2 miR-375 及 PDK1 在胰腺癌细胞株中的表达

qRT-PCR 结果显示 miR-375 在胰腺癌细胞株 Panc-1、SW1990、Patu8988、HEK293 中的表达量分别为(0.026 ± 0.001)、(0.063 ± 0.003)、(0.085 ± 0.014)和(0.202 ± 0.035),miR-375 在 Panc-1 中表达较 HEK293 中明显降低($P < 0.001$),见图 3,故用于后续转染,验证 miR-375 表达上调后 PDK1 表达情况。

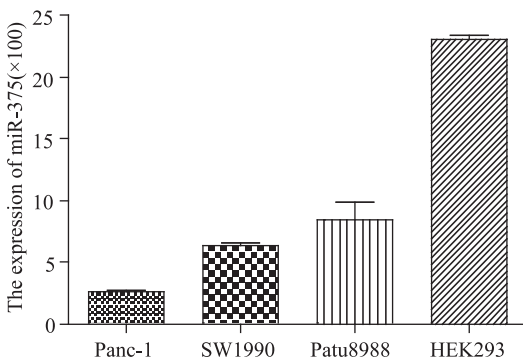


图 3 不同胰腺癌细胞中 miR-375 的相对表达量
Figure 3 The expression of miR-375 in pancreatic cell lines and HEK293

qRT-PCR 结果显示 PDK1 在胰腺癌细胞株 Panc-1、SW1990、Patu8988、HEK293 中的表达量分别为(0.013 ± 0.001)、(0.061 ± 0.004)、(0.066 ± 0.006)和(0.010 ± 0.000),PDK1 在 Panc-1 中表达较 HEK293 中明显增高($P < 0.05$),见图 4。

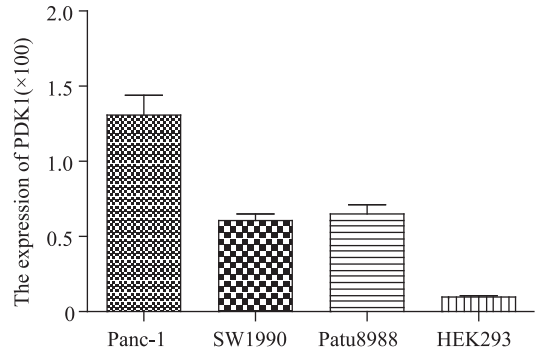


图 4 不同胰腺癌细胞中 PDK1 的相对表达量
Figure 4 The expression of PDK1 in pancreatic cell lines and HEK293

2.3 上调 Panc-1 中 miR-375 表达后 PDK1 mRNA 和蛋白的表达变化

转染 miR-375mimics 后提取总 RNA 进行 QRT-PCR 检测,空白(Control)组、miR-375-NC 组、miR-375-mimics 实验组 PDK1 mRNA 表达量分别为(0.013 ± 0.001)、(0.014 ± 0.009)和(0.003 ± 0.000),见图 5。提取总蛋白行 Western blot 检测 Control 组、miR-375-NC 组、miR-375-mimics 组 PDK1 蛋白表达量分别为(0.347 ± 0.040)、(0.383 ± 0.054)和(0.092 ± 0.026),见图 6。统计结果显示相对于空白组和阴性对照组,实验组中 PDK1 mRNA 和蛋白的表达均明显降低($P < 0.05$),而空白组和阴性对照组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

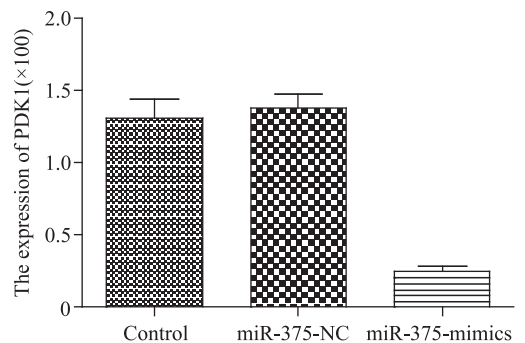


图 5 转染后不同胰腺癌细胞中 PDK1 mRNA 的相对表达量
Figure 5 The expression of PDK1 mRNA in pancreatic cell lines after transfection

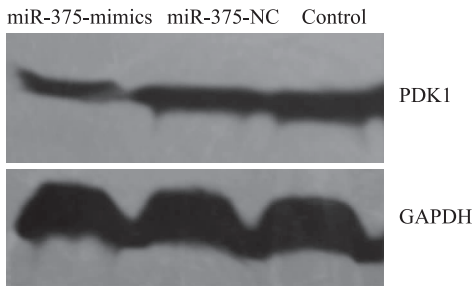


图 6 转染后不同胰腺癌细胞中 PDK1 蛋白的相对表达量
Figure 6 The expression of PDK1 protein in pancreatic cell lines after transfection

3 讨论

胰腺癌源于多基因突变的连续性累积^[7]。在过去几十年中,人们对癌相关基因异常表达的认识有了显著进展,特异性 miRNAs 影响了抑癌基因或癌基因,或许可成为胰腺癌早期诊断、药物治疗潜在靶点的关键性生物标志物。虽然由内源性和外源性因素对癌基因和抑癌基因的调控在胰腺癌进展中发挥了重要作用^[7-10],但是胰腺癌发病的确切分子机制及进展原因仍不清楚。

近年来 miRNA 与肿瘤的发生、发展逐渐成为研究的热门领域。它是一种长约 22 个核苷酸的非蛋白编码 RNA 分子,其与目的基因结合降解 mRNA 和(或)抑制其翻译,可通过多种基因沉默方式调控基因功能。它们在动植物中参与转录后基因表达调控,对个体生长发育以及包括肿瘤在内的多种疾病的发生、发展起着重要调节作用^[11]。这些分子在种系上具有高度保守性,在细胞生存、增殖、分化、凋亡、血管生成等过程中发挥重要作用^[5-6]。miRNA 在不同细胞、组织、疾病中表达方式不同,而这种表达方式的改变在肿瘤形成过程中发挥重要作用。研究表明 miRNAs 和肿瘤的发生、发展密切相关,多个基因被证实为癌基因和抑癌基因。目前只有少部分 miRNAs 的生物学功能得到确定。因此,对在肿瘤中表达具有显著差异的 miRNAs 进行生物学功能研究是必要。Bloomston 等^[12]等研究发现了许多 miRNA 的通用表达模式,可用于区分胰腺导管腺癌和慢性胰腺炎,而表达下调的 miRNA 包括 miR-375 可用于鉴别正常胰腺和胰腺炎症组织。Szafranska 等^[13]首次全面描述了胰腺组织中 miRNA 的表达谱,他的一项重要发现就是 miR-196a、miR-196b、miR-203、miR-210、miR-222、miR-216、miR-217 和 miR-375 仅在胰腺癌组织标本中异常表达。本实验在通过 qRT-PCR 方法证实胰腺癌

组织中 miR-375 表达下调,与文献报道^[12]一致。在细胞实验中同样得到验证,用 qRT-PCR 的方法检测了 3 种胰腺癌细胞株中 miR-375 的表达情况,以 HEK293 作为参照,结果发现,miR-375 在 3 株胰腺癌细胞系中 Panc-1 表达最低,可用于后续 miR-375 转染实验,验证上调 miR-375 表达对 PDK1 的影响。

目前关于 miR-375 的研究报道尚不多见。人类 miR-375 基因含有 22 个基因,其定位于染色体 2q35 的 CpG 岛。最初关于 miR-375 的相关研究只局限于胰腺,近年来一些研究发现 miR-375 在许多恶性肿瘤中表达异常,如头颈部鳞癌^[14]、肝癌^[15]和胰腺肿瘤^[13]等。本实验通过将 miR-375-mimics、miR-375-NC 分别转染入 Panc-1 细胞株中,qRT-PCR 方法鉴定 miR-375 表达水平,miR-375-mimics 组表达上调验证其转染成功,与 miR-375-NC 组和 Control 组差异具有统计学意义($P < 0.05$),而 miR-375-NC 组和 Control 组差异无统计学意义($P > 0.05$),达到预期效果。转染成功后,验证了 PDK1 mRNA 和蛋白水平表达的变化,证实 miR-375-mimics 组 PDK1 表达明显下调,与 miR-375-NC 组和 Control 组差异具有统计学意义($P < 0.05$),而 miR-375-NC 组和 Control 组差异无统计学意义($P > 0.05$)。

结合生物学信息预测网站预测,PDK1 可能是 miR-375 调控的靶基因之一,miR-375 与 PDK1 的 3'非翻译端(3'-UTR)互补,可干扰其转录后翻译。本实验证实了 miR-375 与 PDK1 具有负相关性,PDK1 可能是 miR-375 调控的靶基因之一。PI3K/PKB 细胞生存信号通路与肿瘤的形成密切相关,PDK1 作为关键的 PKB 上游激活因子,与肿瘤之间也存在密切的关系。例如,PDK1 能够引起老鼠乳腺表皮细胞发生转化,促进肿瘤的形成^[16]。干扰 PDK1 基因导致细胞生存和扩散受阻^[17]。研究发现 miR-375 的外源性表达可抑制 PDK1 表达,抑制胰腺癌细胞中 Akt 磷酸化。这与之前文献报道的在胰腺 β 细胞中 miR-375 可直接调控 PDK1 蛋白表达的结果一致^[18]。有研究表明,Akt 的磷酸化可促进许多不同种类肿瘤细胞生存^[19-20],Akt 活化与预后不良有关^[21]。因此,miR-375 表达下调可能通过 PDK1/Akt 旁路的激活而影响胰腺癌细胞增殖、凋亡等生物学行为^[22]。

综上所述,miR-375 在胰腺癌细胞中可起到抑

癌基因的作用,可能靶向调控 PDK1,通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路对胰腺癌的发生、发展及转移发生作用,有可能成为胰腺癌临床生物治疗的新靶点,但其在胰腺癌发生、发展、转移中的详细机制尚有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Zhao YP. Status quo and future of diagnosis and treatment of pancreatic cancer[J]. *Zhonghua Gan Dan Wai Ke Za Zhi*, 2009, 15(5):321-3. [赵玉沛. 胰腺癌诊断与治疗的现状与未来[J]. 中华肝胆外科杂志, 2009, 15(5):321-3.]
- [2] Gu K, Wu CX, Bao PP, *et al.* Incidence of pancreatic cancer in shanghai; a current, retrospective and comparative exploration [J]. *Wai Ke Li Lun Yu Shi Jian*, 2009, 14(5):510-5. [顾凯, 吴春晓, 鲍萍萍, 等. 上海市胰腺癌流行现状、回顾与比较分析[J]. 外科理论与实践, 2009, 14(5):510-5.]
- [3] Guo X, Cui Z. Current diagnosis and treatment of pancreatic cancer in China[J]. *Pancreas*, 2005, 31(1):13-22.
- [4] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012[J]. *CA Cancer J Clin*, 2012, 62(1):10-29.
- [5] Farh KK, Grimson A, Jan C, *et al.* The widespread impact of mammalian microRNAs on mRNA repression and evolution [J]. *Science*, 2005, 310(5755):1817-21.
- [6] Ambros V. The functions of animal microRNAs[J]. *Nature*, 2004, 431(7006):350-5.
- [7] Goggins M. Molecular markers of early pancreatic cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(20):4524-31.
- [8] Bardeesy N, DePinho RA. Pancreatic cancer biology and genetics[J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(12):897-909.
- [9] Goggins M, Kern SE, Offerhaus JA, *et al.* Progress in cancer genetics; lessons from pancreatic cancer[J]. *Ann Oncol*, 1999, 10(Suppl 4):4-8.
- [10] Sakorafas GH, Tsiotou AG. Multi-step pancreatic carcinogenesis and its clinical implications[J]. *Eur J Surg Oncol*, 1999, 25(6):562-5.
- [11] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2):281-97.
- [12] Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, *et al.* MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis [J]. *JAMA*, 2007, 297(17):1901-8.
- [13] Szafranska AE, Davison TS, John J, *et al.* MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Oncogene*, 2007, 26(30):4442-52.
- [14] Avissar M, Christensen BC, Kelsey KT, *et al.* MicroRNA expression ratio is predictive of head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(8):2850-5.
- [15] Ladeiro Y, Couchy G, Balabaud C, *et al.* MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations [J]. *Hepatology*, 2008, 47(6):1955-63.
- [16] Zeng X, Xu H, Glazer RI. Transformation of mammary epithelial cells by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) is associated with the induction of protein kinase Calpha [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(12):3538-43.
- [17] Flynn P, Wongdagger M, Zavar M, *et al.* Inhibition of PDK-1 activity causes a reduction in cell proliferation and survival [J]. *Curr Biol*, 2000, 10(22):1439-42.
- [18] El Ouaamari A, Baroukh N, Martens GA, *et al.* miR-375 targets 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and regulates glucose-induced biological responses in pancreatic beta-cells [J]. *Diabetes*, 2008, 57(10):2708-17.
- [19] Franke TF. PI3K/Akt; getting it right matters [J]. *Oncogene*, 2008, 27(50):6473-88.
- [20] Testa JR, Bellacosa A. AKT plays a central role in tumorigenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(20):10983-5.
- [21] Cinti C, Vindigni C, Zamparelli A, *et al.* Activated Akt as an indicator of prognosis in gastric cancer [J]. *Virchows Arch*, 2008, 453(5):449-55.
- [22] Westmoreland JJ, Wang Q, Bouzaffour M, *et al.* Pdk1 activity controls proliferation, survival, and growth of developing pancreatic cells [J]. *Dev Biol*, 2009, 334(1):285-98.

[编辑校对:刘红武]