

长链非编码RNA VLDLR对人胰腺癌细胞 增殖和迁移能力的影响

孙姚承¹ 王大为² 徐 岷² 周海浪² 龚爱华³ 陈吉祥^{1*}

(¹江苏大学附属医院普外科, 镇江 212001; ²江苏大学附属医院消化内科, 镇江 212001;

³江苏大学医学院, 镇江 212013)

摘要 该文探讨了长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA) VLDLR在胰腺癌组织及5株细胞系中的表达, 并分析了其对细胞增殖和迁移能力的影响。通过定量反转录PCR(quantitative reverse transcription PCR, qRT-PCR)检测VLDLR在14例胰腺癌组织和对应癌旁组织及5株细胞系中的表达水平, 并进一步利用RNA干扰(ribonucleic acid interference, RNAi)技术探讨VLDLR的生物学功能。CCK-8和克隆形成实验检测细胞增殖能力, Transwell实验检测细胞迁移能力, Western blot检测蛋白质表达。结果发现, 14例胰腺癌组织中, VLDLR相对表达水平为 4.49 ± 5.85 ($P < 0.05$), VLDLR在5株胰腺癌细胞中差异性表达。与对照组相比, 实验组细胞中VLDLR mRNA水平明显降低(t 分别为32.43、19.02, $P < 0.05$); 细胞增殖、细胞克隆形成及迁移能力明显均降低($P < 0.05$), 基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)和MMP-9蛋白质水平降低($P < 0.05$)。该研究结果表明, VLDLR在胰腺癌中高表达, 下调VLDLR表达可降低胰腺癌细胞的增殖和迁移能力。

关键词 长链非编码RNA; VLDLR; 胰腺癌; 细胞增殖; 细胞迁移

Effects of Long Non-Coding RNA VLDLR on Proliferation and Migration of Human Pancreatic Cancer Cell

Sun Yaocheng¹, Wang Dawei², Xu Min², Zhou Hailang², Gong Aihua³, Chen Jixiang^{1*}

(¹Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, China;

²Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, China;

³School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract The aim of this paper is to investigate the expression profile of long non-coding RNA VLDLR in pancreatic cancer tissues and 5 different cell lines and the effect of VLDLR on the proliferation and migration of pancreatic cancer cell. Quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) was performed to detect the relative expression of VLDLR in 14 cases of pancreatic cancer tissues and corresponding para-carcinoma tissues and five cell lines. The proliferation rates were examined by CCK-8 and colony formation assays. The migration rates were examined by Transwell assays. The relative level of the protein was detected by Western blot. The relative level of VLDLR mRNA in 14 cases of pancreatic cancer tissues was 4.49 ± 5.85 ($P < 0.05$). The relative level of VLDLR mRNA were different in five pancreatic cancer cell lines. Compared with the control group, VLDLR mRNA level was decreased ($t=32.43, 19.02, P < 0.05$) and the ability of proliferation, cell colony-forming and migration were

收稿日期: 2016-12-30 接受日期: 2017-03-28

国家自然科学基金(批准号: 81472333、81372718、81672402)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0511-85022219, E-mail: cyok9@163.com

Received: December 30, 2016 Accepted: March 28, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81472333, 81372718, 81672402)

*Corresponding author. Tel: +86-511-85022219, E-mail: cyok9@163.com

网络出版时间: 2017-05-19 16:48:01 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170519.1648.008.html>

significantly inhibited in experiment group ($P < 0.05$). The protein levels of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 were reduced ($P < 0.05$). These results indicated that the expression of VLDLR was up-regulated in pancreatic cancer. Knockdown of VLDLR could decrease the proliferation and migration of pancreatic cancer cell.

Keywords Long non-coding RNA; VLDLR; pancreatic cancer; cell proliferation; cell migration

胰腺癌(pancreatic cancer, PC)是最致命的恶性肿瘤之一,预后极差,5年生存率不及5%^[1-2]。PC预后差的主要原因是早期缺乏特异性临床症状、无有效的早期诊断标志物、早期转移及对标准的放化疗效果差^[3]。迄今为止,根治性手术切除仍是有望治愈胰腺癌的唯一途径^[4]。然而,超过80%的患者就诊时已属晚期,胰腺癌外科治疗效果仍不容乐观。胰腺癌发生机制复杂,目前尚不十分明确,寻找新的诊断治疗靶点是胰腺癌研究的重点。

长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是一类长度大于200 nt的RNA,缺乏明显的开放阅读框架,不能参与编码蛋白质,起初被认为是基因组转录的“噪音”^[5]。随着对lncRNA研究的不断深入,科学家发现,在不同的肿瘤组织中、肿瘤组织与相邻正常组织间存在表达差异,包括胰腺癌,它们在致癌、抑癌机制中均发挥相关作用。目前发现,lncRNA VLDLR在肝细胞癌组织中高表达,且在肝细胞癌的化疗抵抗中发挥作用^[6]。然而,VLDLR在胰腺癌中的具体生物学功能尚不清楚。因此,本研究应用细胞和分子生物学技术检测VLDLR在胰腺癌组织和细胞株中的表达,并观察其对胰腺癌细胞增殖活力和迁移能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和组织 人胰腺癌细胞株(PANC1、PaTu8988、SW1990、BxPC3、Capan2)由江苏大学医学院细胞生物学实验室保存。组织标本来源于本院2014年2月至2016年1月经病理确诊的14例胰腺癌患者,取经手术切除的14例癌组织及对应癌旁组织标本。该研究已经获得了医院伦理委员会的批准,且所有受试对象均知情。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清和DMEM购于Gibco公司。Trizol试剂和Lipofectamine™ 2000购于Invitrogen公司。反转录试剂盒和ECL试剂盒购于Thermo公司。鼠抗人 β -tubulin抗体和2×SYBRGreen实时定量PCR预混合溶液购于Bioworld公司。兔抗人MMP-

2(matrix metalloproteinase-2)抗体和兔抗人MMP-9抗体购于Cell Signaling Technology公司。CCK-8试剂购于南京诺唯赞生物科技有限公司。Transwell小室购于Corning公司。结晶紫染色液购于Beyotime公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞转染 细胞培养至对数生长期,用PBS洗2次,胰蛋白酶消化5 min后终止消化,离心5 min,10% FBS-DMEM重悬细胞并计数,取 2.5×10^5 细胞接种至6孔板中并混匀,置于37 °C、含5% CO₂的培养箱中孵育。24 h后将siRNA和Lipofectamine™ 2000分别加入Opti-MEM中,轻轻振摇5 min后混匀,制成转染液,室温静置25 min后将转染液加入细胞中,轻轻混匀,孵育6 h后弃去转染液,加入10% FBS-DMEM继续培养。VLDLR干扰RNA(si-VLDLR)及阴性对照(si-NC)序列由吉玛公司合成。si-VLDLR上游序列:5'-GCA CAA CAC CCA AAG ACA UTT-3',下游:5'-AUG UCU UUG GGU GUU GUG CTT-3'; si-NC上游序列:5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3',下游:5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT-3'。

1.2.2 qRT-PCR检测VLDLR mRNA的水平 按照Trizol试剂说明书提取5种胰腺癌细胞(PANC1、PaTu8988、SW1990、BxPC3、Capan2)和胰腺癌组织RNA,反转录成cDNA,分别以cDNA为模板扩增VLDLR、U6。qRT-PCR反应条件:98 °C预变性30 s;98 °C变性10 s,56 °C退火30 s,72 °C延伸10 s,共40个循环;4 °C保存。VLDLR上游引物序列:5'-AGC AGT CAC ATT CAT CGC AC-3',下游引物序列:5'-GAG GAA TAG GTG CGA ACT GC-3'。U6上游引物序列:5'-GCG CGT CGT GAA GCG TTC-3',下游引物序列:5'-GTG CAG GGT CCG AGG T-3'。U6作为内参,计算VLDLR相对表达量(RQ值),计算公式为: $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参}}$, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{实验组}} - \Delta Ct_{\text{对照组}}$, $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$,将对照组目的基因mRNA的相对表达量作为1。

1.2.3 Western blot 转染48 h后收集对照组与实验组细胞,100 °C煮沸10 min,12 000 r/min离心5 min。10% SDS-PAGE分离蛋白质,300 mA转至PVDF膜。

5%脱脂奶粉常温封闭1 h, 一抗4 °C孵育过夜; TBST洗膜3次, 每次10 min。室温下二抗孵育1 h, TBST洗膜3次, 每次10 min。ECL化学发光检测显影, 凝胶成像系统拍照, Quantity One软件分析条带灰度值。

1.2.4 CCK-8法检测细胞增殖能力 将PaTu8988和SW1990细胞随机分为对照组和实验组, 分别转染si-NC和si-VLDLR。以 $(2.5\sim 3.5)\times 10^3$ /孔接种细胞于96孔板中, 每组设4个复孔, 将10 μ L CCK-8溶液分别于24、48、72、96 h加入2组细胞, 于细胞培养箱避光孵育2 h, 490 nm处测量光密度值, 重复3次, 取平均值, 计算细胞相对增殖率, 并绘制生长曲线。

1.2.5 克隆形成实验检测细胞增殖能力 对照组和实验组PaTu8988和SW1990细胞分别转染si-NC和si-VLDLR, 12 h后用0.25%胰蛋白酶消化, 按每孔500、1 000、2 000的细胞密度分别混合均匀后接种于6孔板中, 每组设3个平行样品, 培养箱孵育9~12 d。当6孔板中出现肉眼可见的克隆时终止培养。用4%多聚甲醛溶液固定20 min, 结晶紫染色30 min, 观察并拍照, 计数细胞克隆数, 结果取平均值。

1.2.6 Transwell迁移实验检测细胞迁移能力 对照组和实验组细胞分别转染si-NC和si-VLDLR, 48 h后以0.25%胰蛋白酶消化, PBS洗2次, 600 r/min离心4 min, 弃上清液。加600 μ L无血清DMEM重悬细胞, 计数板计数细胞, 将 1×10^6 细胞种入Transwell小室(不含基质胶)上层, 小室下层加入500 μ L含血清的DMEM置于细胞培养箱孵育。36~48 h后将小室取出, 吸尽培养基, 将小室于4%多聚甲醛固定20 min, 结晶

紫染色30 min, 观察拍照, 计数细胞迁移数, 结果取平均值。

1.3 统计分析

应用GraphPad Prism 5软件进行统计学分析, 实验所得数据用平均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 独立样本采用*t*检验, 组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胰腺癌组织及胰腺癌细胞中VLDLR mRNA水平

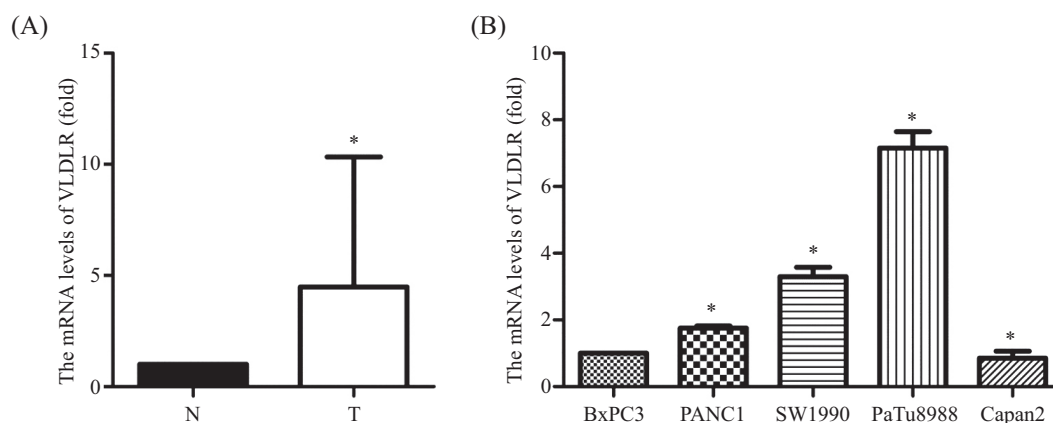
qRT-PCR检测14例胰腺癌组织和对应癌旁组织中VLDLR的mRNA水平。经 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算, 与N组(癌旁组织)相比, T组(癌组织)的VLDLR相对水平为 4.49 ± 5.85 , 明显增高, 差异具有统计学意义($P<0.05$) (图1A)。qRT-PCR结果表明, 以BxPC3相对表达量为1, 胰腺癌细胞中VLDLR mRNA水平由高到低依次为: PaTu8988>SW1990>PANC1>BxPC3>Capan2($P<0.05$) (图1B)。根据实验结果选择在PaTu8988和SW1990细胞中干扰VLDLR的表达水平, 并检测其对细胞增殖和迁移能力的影响。

2.2 转染si-VLDLR下调VLDLR mRNA水平

qRT-PCR结果表明, 与si-NC组相比, si-VLDLR组中VLDLR mRNA相对水平明显降低(*t*分别为32.43和19.02, $P<0.05$) (图2)。

2.3 下调VLDLR表达抑制胰腺癌细胞的增殖

CCK-8实验结果显示, si-VLDLR组48、72、96 h

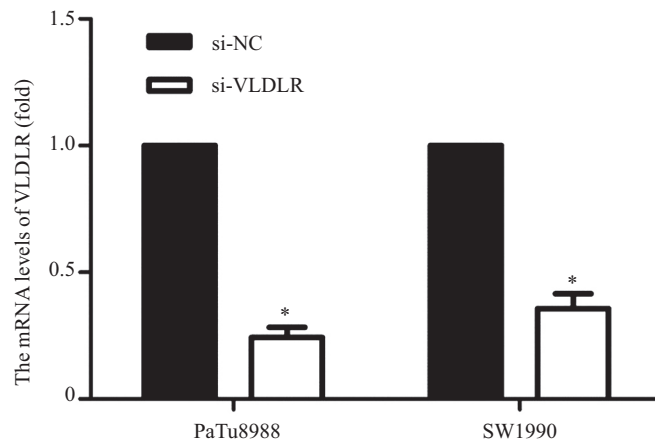


A: 胰腺癌组织中VLDLR mRNA相对水平(N: 癌旁组织; T: 癌组织), $*P<0.05$, 与N组相比较; B: 胰腺癌细胞中的VLDLR mRNA相对水平, $*P<0.05$, 代表各组的均数不全相同。

A: VLDLR mRNA levels in pancreatic cancer tissues (N: para-carcinoma tissue; T: pancreatic cancer tissue); $*P<0.05$ vs N group; B: VLDLR mRNA levels in pancreatic cancer cell lines. $*P<0.05$, the mean for each group is not the same.

图1 胰腺癌组织及胰腺癌细胞中VLDLR mRNA水平

Fig.1 The mRNA levels of VLDLR in pancreatic cancer tissues and cell lines

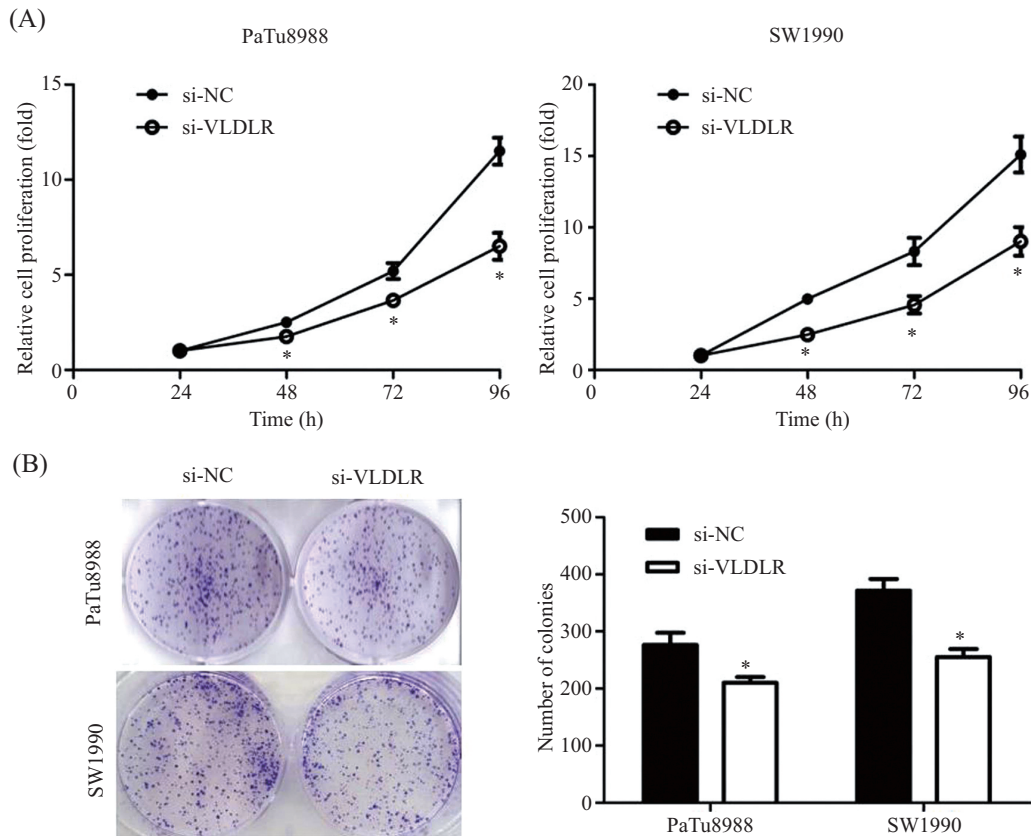


* $P < 0.05$, 与si-NC组相比较。

* $P < 0.05$ vs si-NC group.

图2 转染si-VLDLR下调VLDLR mRNA水平

Fig.2 The mRNA levels of VLDLR significantly reduced in si-VLDLR group



A: CCK-8实验; B:克隆形成实验。* $P < 0.05$, 与si-NC组相比较。

A: CCK-8 assay; B: colony formation assay. * $P < 0.05$ vs si-NC group.

图3 下调VLDLR表达对细胞增殖能力的影响

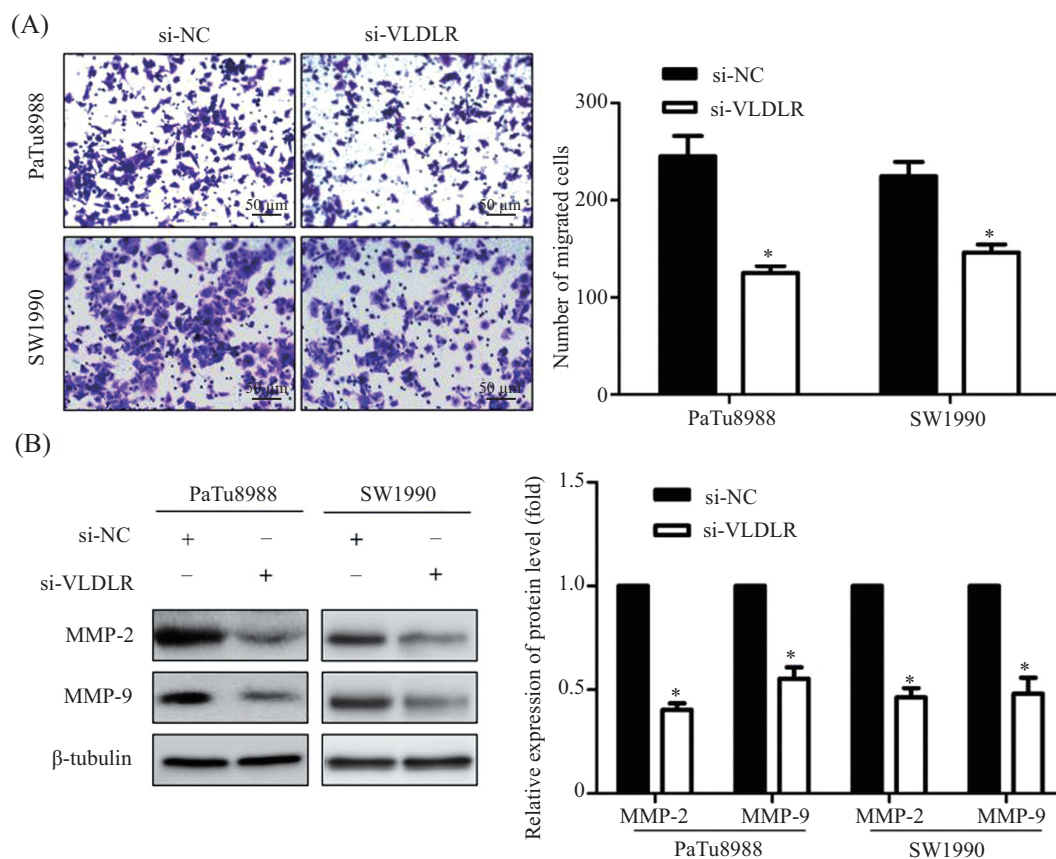
Fig.3 Effects of down-regulated expression of VLDLR on cell proliferation ability

细胞增殖率明显低于si-NC组($P < 0.05$)。克隆形成实验结果显示, si-VLDLR组克隆形成数明显低于si-NC组(t 分别为4.89和8.07, $P < 0.05$)(图3)。这些结果表明, 下调VLDLR的表达能够明显抑制胰腺癌细

胞的增殖。

2.4 下调VLDLR表达抑制胰腺癌细胞的迁移

Transwell迁移实验结果显示, si-NC组穿膜细胞数明显高于si-VLDLR组(t 分别为7.59和6.42, $P < 0.05$)



A: Transwell 迁移实验; B: 免疫印迹检测MMP-2和MMP-9蛋白质水平。* $P < 0.05$, 与si-NC组相比较。

A: Transwell assay; B: the protein levels of MMP-2 and MMP-9 detected by Western blot. * $P < 0.05$ vs si-NC group.

图4 下调VLDLR表达对细胞迁移能力的影响

Fig.4 Effects of down-regulated expression of VLDLR on cell migration ability

(图4A)。由此表明, 下调VLDLR的表达可明显抑制胰腺癌细胞的迁移。免疫印迹法结果表明, 与si-NC组相比, si-VLDLR组胰腺癌细胞中MMP-2和MMP-9蛋白质相对水平明显降低($P < 0.05$)(图4B)。

3 讨论

近年来, ncRNA在肿瘤发生、发展中的调控作用逐渐引起人们的关注。在人类基因组中, ncRNA广泛存在于细胞核和胞质内, 包括微小RNA(microRNA, miRNA)、Piwi相互作用RNA(Piwi-interacting RNA, piRNA)及lncRNA等。迄今为止, 大量miRNA在肿瘤抑制和形成中的作用已经得到证实^[7]。随着研究的深入, 越来越多的证据表明, lncRNA在细胞生物学进程中有着重要作用, 如细胞增殖和凋亡^[8]、细胞侵袭转移^[9]、干细胞多能性^[10]、药物抵抗^[11]等。多个lncRNA已被发现与胰腺癌具有密切关系。例如, lncRNA UCA1被证实与胰腺癌肿瘤大小、浸润深度、肿瘤分期有关^[12], lncRNA uc.345能促进胰腺癌的进

程影响总体生存时间^[13], lncRNA MALAT1(metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1)能促进胰腺癌细胞的增殖和侵袭^[14]。然而, VLDLR在胰腺癌中的具体生物学功能尚不清楚。

本研究证实, 胰腺癌组织中普遍呈现出VLDLR高表达的特点。VLDLR在5株不同胰腺癌细胞系中的表达具有差异性, 在PaTu8988和SW1990细胞中相对高表达, 而在BxPC3和Capan2细胞中相对低表达。为探讨VLDLR异常表达在胰腺癌发生、发展中可能的生物学作用, 本研究采用细胞转染的方法对其增殖和迁移能力进行分析。本研究发现, 在胰腺癌细胞中干扰VLDLR的表达能抑制细胞增殖的能力, 与之前在肝细胞癌中的报道一致^[6]。另一方面, 癌细胞的迁移和侵袭能力是其恶性生物学行为的表现, 也是影响疾病进展和预后的重要因素, 在胰腺癌细胞中干扰VLDLR的表达能抑制细胞迁移的能力。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是一类与肿瘤侵袭转移密切相关的蛋白水解酶。

MMPs降解细胞外基质, 重塑细胞黏附力, 促进合成和释放多种调节血管生长的因子, 促进血管生成, 激发其他一些潜在的生物活性, 参与肿瘤的免疫过程, 因而在肿瘤侵袭转移中起到关键作用^[15]。本研究结果显示, 干扰VLDLR后, 在胰腺癌细胞中MMP-2和MMP-9表达量降低, 提示VLDLR可能通过调控MMPs的表达参与了胰腺癌侵袭转移。本研究未分析VLDLR与胰腺癌的某些预后影响因素如肿瘤的TNM分期、分化类型、肿瘤大小及生存时间的关联性, 这些还需进一步研究。

综上所述, 胰腺癌组织中VLDLR表达明显上调, 干扰VLDLR能够显著抑制胰腺癌细胞的增殖和迁移, 提示VLDLR作为胰腺癌的原癌基因, 在胰腺癌的发生、发展中扮演着重要的角色, 但其具体分子机制有待进一步研究。同时, 通过靶向干扰VLDLR来抑制胰腺癌细胞的增殖和迁移有望为胰腺癌治疗提供新思路。

参考文献 (References)

- Chio II, Jafarnejad SM, Ponz-Sarvisse M, Park Y, Rivera K, Palm W, *et al.* NRF2 promotes tumor maintenance by modulating mRNA translation in pancreatic cancer. *Cell* 2016; 166(4): 963-76.
- Schlomann U, Koller G, Conrad C, Ferdous T, Golfi P, Garcia AM, *et al.* ADAM8 as a drug target in pancreatic cancer. *Nat Commun* 2015; 6: 6175.
- Kaur S, Baine MJ, Jain M, Sasson AR, Batra SK. Early diagnosis of pancreatic cancer: Challenges and new developments. *Biomark Med* 2012; 6(5): 597-612.
- Zhang Q, Chen S, Zeng L, Chen Y, Lian G, Qian C, *et al.* New developments in the early diagnosis of pancreatic cancer. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2017; 11(2): 149-56.
- Zhang H, Zhou D, Ying M, Chen M, Chen P, Chen Z, *et al.* Expression of long non-coding RNA (lncRNA) small nucleolar RNA host gene 1 (SNHG1) exacerbates hepatocellular carcinoma through suppressing miR-195. *Med Sc Monit* 2016; 22: 4820-9.
- Takahashi K, Yan IK, Wood J, Haga H, Patel T. Involvement of extracellular vesicle long noncoding RNA (linc-VLDLR) in tumor cell responses to chemotherapy. *Mol Cancer Res* 2014; 12(10): 1377-87.
- Xu J, Li J, Zheng TH, Bai L, Liu ZJ. MicroRNAs in the occurrence and development of primary hepatocellular carcinoma. *Adv Clin Exp Med* 2016; 25(5): 971-5.
- Peng W, Wang Z, Fan H. LncRNA NEAT1 impacts cell proliferation and apoptosis of colorectal cancer via regulation of Akt signaling. *Pathol Oncol Res* 2016; doi: 10.1007/s12253-016-0172-4.
- Yang ZY, Yang F, Zhang YL, Liu B, Wang M, Hong X, *et al.* LncRNA-ANCR down-regulation suppresses invasion and migration of colorectal cancer cells by regulating EZH2 expression. *Cancer Biomark* 2017; 18(1): 95-104.
- Zhu P, Wang Y, Wu J, Huang G, Liu B, Ye B, *et al.* LncBRM initiates YAP1 signalling activation to drive self-renewal of liver cancer stem cells. *Nat Commun* 2016; 7: 13608.
- Wang Q, Cheng N, Li X, Pan H, Li C, Ren S, *et al.* Correlation of long non-coding RNA H19 expression with cisplatin-resistance and clinical outcome in lung adenocarcinoma. *Oncotarget* 2017; 8(2): 2558-67.
- Chen P, Wan D, Zheng D, Zheng Q, Wu F, Zhi Q. Long non-coding RNA UCA1 promotes the tumorigenesis in pancreatic cancer. *Biomed Pharmacother* 2016; 83: 1220-6.
- Liu C, Wang J, Yuan X, Qian W, Zhang B, Shi M, *et al.* Long noncoding RNA uc.345 promotes tumorigenesis of pancreatic cancer by upregulation of hnRNPL expression. *Oncotarget* 2016; 7(44): 71556-66.
- Li L, Chen H, Gao Y, Wang YW, Zhang GQ, Pan SH, *et al.* Long noncoding RNA MALAT1 promotes aggressive pancreatic cancer proliferation and metastasis via the stimulation of autophagy. *Mol Cancer Ther* 2016; 15(9): 2232-43.
- Grzelczyk WL, Szemraj J, Jozefowicz-Korczynska M. The matrix metalloproteinase in larynx cancer. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2016; 70(0): 1190-7.