

## 胰岛素通过 MMP-2、7、9 促进胰腺癌细胞侵袭与迁移

郭松, 彭云鹏, 陆子鹏, 傅跃, 尹凌帝, 苗毅\*

(南京医科大学第一附属医院胰腺中心, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:研究胰岛素对人胰腺癌细胞侵袭与迁移的作用及其可能机制。方法:RT-qPCR、Western blot 检测胰腺癌细胞株胰岛素受体(insulin receptor, IR)的表达。CCK8 检测不同浓度胰岛素刺激下胰腺癌细胞的活性并确定其最适浓度;适宜浓度胰岛素刺激下, CCK8 检测胰腺癌细胞增殖能力的改变;通过 Transwell 实验, 检测胰岛素刺激条件下胰腺癌细胞侵袭与迁移能力的变化;Western blot 检验胰岛素刺激后胰腺癌细胞基质金属蛋白酶(matrix metalloprotease, MMP)-2、7、9 的表达变化。结果:胰腺癌细胞株 PANC-1 和 Miapaca-2 的 IR 表达相对高( $P<0.05$ );胰岛素浓度为 100 nmol/L 时,对上述两细胞活性影响最大( $P<0.05$ );胰岛素能明显促进 PANC-1 和 Miapaca-2 的增殖、迁移与侵袭( $P<0.05$ );胰岛素刺激后胰腺癌细胞迁移与侵袭的改变可能与其 MMP-2、7、9 的表达增加相关( $P<0.05$ )。结论:胰岛素可能通过增强 MMP-2、7、9 表达促进胰腺癌细胞株 PANC-1 和 Miapaca-2 的迁移及侵袭。

**[关键词]** 胰岛素;金属基质蛋白酶;迁移;侵袭

**[中图分类号]** R735.9

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2017)09-1104-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20170907

## Insulin promotes the invasion and migration of pancreatic cancer cells through MMP-2, 7, and 9

Guo Song, Peng Yunpeng, Lu Zipeng, Fu Yue, Yin Lingdi, Miao Yi\*

(Pancreas Centre, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effect of insulin on the pancreatic cancer cell lines and the potential mechanisms. **Methods:** The expression of insulin receptor (IR) was evaluated by qRT-PCR and Western blot. We examined the effect of insulin with different concentrations on the viability of pancreatic cancer cell lines to choose optimal concentration. After insulin treatment, the viability of pancreatic cancer cells was measured by CCK-8 assay; Invasion and migration of cells were measured by a Transwell chamber assay; Western blot was used to observe the expression of matrix metalloprotease (MMP)-2, MMP-7 and MMP-9. **Results:** Pancreatic cancer cell lines PANC-1 and Miapaca-2 showed relatively higher expression of IR ( $P<0.05$ ). The cell lines had significantly enhanced viability ( $P<0.05$ ) when treated with insulin of 100 nmol/L. CCK-8 assay showed that the proliferation of the cell lines was increased significantly. Transwell chamber assay showed that insulin significantly enhanced the invasion and migration of pancreatic cancer cells ( $P<0.05$ ). Western blot proved that the expression of MMP-2, 7 and 9 was remarkably increased. **Conclusion:** Insulin can enhance the invasion and migration of pancreatic cancer cell lines by up-regulating MMP-2, 7 and 9.

**[Key words]** insulin; matrix metalloprotease; migration; invasion

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(09):1104-1108]

胰腺癌严重威胁人类健康, 是全球肿瘤致死率第 5 的肿瘤, 最新公布的 5 年生存率约为 8%<sup>[1]</sup>。近 10 年来, 胰腺癌发病率在全球范围内有明显上升趋势, 有学者预测, 至 2030 年胰腺癌将成为病死率排

名第 2 的肿瘤<sup>[2]</sup>。在国内, 每年胰腺癌新发病例 9 万余例, 致死近 8 万人, 严重影响国人的健康<sup>[3]</sup>。

95%的胰腺癌为胰腺导管腺癌, 细胞起源和发病机制尚不明确<sup>[4]</sup>。由于基因突变复杂、高度耐受缺氧、微环境显著纤维化等原因, 现有的药物治疗效果不佳, 根治性手术是唯一可能治愈胰腺癌的手段<sup>[5]</sup>。但由于胰腺癌起病隐匿, 早期症状不明显, 发现时多为晚期, 仅有 15%~20%的患者有机会接受根治性手

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81272239, 81672449); 江苏省普通研究生科研创新计划项目(KYLX15\_0594)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: miaoyi@njmu.edu.cn

术<sup>[6]</sup>,因此探索新的治疗策略迫在眉睫。

胰腺癌易伴发糖尿病的现象近年来备受关注,成为胰腺癌领域研究的热点问题<sup>[7]</sup>,50%的胰腺癌患者合并糖尿病<sup>[8-9]</sup>。有研究表明患有 2 型糖尿病的胰腺癌患者死亡风险高于无糖尿病患者<sup>[10]</sup>。部分文献结果显示胰岛素可以促进胰腺癌的发展<sup>[11]</sup>,可以通过与缺氧诱导因子等协同促进胰腺癌细胞的活性<sup>[12]</sup>,有些细胞因子如干扰素  $\beta$  可以作为胰岛素抑制剂来发挥抑癌作用<sup>[13]</sup>。但胰岛素对胰腺癌的具体作用机制尚不明确。本研究拟在体外环境下,使用胰岛素刺激胰腺癌细胞株,观察其增殖、迁移与侵袭能力的变化,并探讨可能的机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人重组胰岛素(I3536,Sigma 公司,美国),使用 0.01 mol/L 的 HCl 溶液配制成 20 mg/mL 储存液储存于 -20 °C 冰箱,实验时配制成相应工作浓度。人胰腺巢蛋白(nestin)阳性上皮细胞 HPNE 购自美国 ATCC 公司,培养液按照 ATCC 官网说明进行配置。人胰腺癌细胞株 SW1990、PANC-1、CFPAC-1、Miapaca-2、BXPC-3(上海中科院细胞库)培养于含 10% 胎牛血清(Gibco 公司,美国)及 1%青-链霉素(青霉素 100 U/mL、链霉素 100  $\mu$ g/mL,Thermo Scientific 公司,美国)的 DMEM(Gibco 公司,美国)中。细胞均置于 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中培养。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 实验分组

在无血清培养条件下,实验组给予不同浓度胰岛素刺激(药物浓度和作用时间见下述实验方法)。对照组用 0.01 mol/L 的 HCL 溶液替代胰岛素。每组实验重复 3 次。

#### 1.2.2 RT-qPCR 检测胰岛素受体(insulin receptor, IR)表达

收集对数生长期细胞,用 TRIzol 试剂(Invitrogen 公司,英国)提取 RNA。将总 RNA 浓度调整为 1  $\mu$ g/ $\mu$ L 分装,置于 -80 °C 保存备用。以 2  $\mu$ L RNA 为模板,构建逆转录反应体系(RR036A-1,TaKaRa 公司,日本),按照说明操作获得 cDNA,-20 °C 保存备用。NCBI 网站查找基因序列,Primer Premier 5.0 软件设计引物,经 Oligo 6.0 软件和 NCBI 网站 Blast 验证。IR 及 GAPDH 基因引物由南京锐真生物科技有限公司合成(表 1)。按照说明书构建 20  $\mu$ L RT-qPCR 反应体系(4913914001,FastStart Universal

表 1 引物序列

Table 1 Primer's sequences of PCR

引物名称	引物序列(5'→3')	产物(bp)
GAPDH	上游:GGATTTGGTCTATTGGG	205
	下游:GGAAGATGGTGATGGGATT	
IR	上游:AAAACGAGGCCCGAAGATTTC	90
	下游:GAGCCCATAGACCCGGAAG	

SYBR Green Master 试剂盒,Roche 公司,美国)。反应参数:预变性 95 °C 10 min;变性 95 °C 15 s,退火 60 °C 60 s,延伸 95 °C 10 min,重复 40 个循环。读取并记录目的基因和内参基因的 Ct 值,通过 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 方法计算目的基因的相对表达水平。

#### 1.2.3 Western blot 检测 IR 表达和基质金属蛋白酶(matrix metalloprotease, MMP)-2、7、9 表达量

收集对数生长期细胞,以及胰岛素刺激 48 h 后的 PANC-1、Miapaca-2 细胞,用全蛋白提取试剂盒(南京凯基公司),按照说明书操作提取蛋白。用 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳;转膜至 PVDF 膜;5%脱脂奶粉封闭 2 h;兔抗人 IR 抗体(L9804,Santa Cruz 公司,美国)、鼠抗人 GAPDH 抗体(ab8245)、兔抗人 MMP-2(ab37150)、兔抗人 MMP-7(ab5706)、兔抗人 MMP-9(ab38898,Abcam 公司,美国)4 °C 孵育过夜;TBST 洗 3 次,每次 10 min;用辣根过氧化物酶标记的抗鼠 IgG 抗体和抗兔 IgG 抗体(Abcam 公司,美国)室温孵育 2 h;TBST 洗 3 次,每次 10 min;用化学发光系统(Amersham Pharmacia Biotech,英国)检测结果,Image J 软件用于图像灰度分析。

#### 1.2.4 CCK8 检测最适浓度及细胞活性

按照 3 000 个/孔将 HPNE、PANC-1、Miapaca-2 接种于 96 孔板,待细胞贴壁后,更换无血清培养基,并向实验组孔中加入不同浓度胰岛素,分别在 0、24、48、72 h 进行检测。用 CCK8 试剂与新鲜培养基预混(1:10),每孔加入 100  $\mu$ L,37 °C 避光孵育 2 h,用全自动酶标仪测定 450 nm 波长下吸光度,参考波长 650 nm。

#### 1.2.5 Transwell 检测细胞迁移侵袭

100 nmol/L 胰岛素刺激 48 h 后,按照 2 $\times$ 10<sup>5</sup> 个/孔将 PANC-1 和 Miapaca-2 细胞接种于 Transwell 小室中,侵袭实验需预先在小室中加入 10% 基质胶,用 20 mg/mL 母液与无血清培养液配制。上室为无血清培养液,下室为全培养液。培养至相应时间,用结晶紫对上室细胞进行染色,拍照。计数染色细胞,对照分析。

### 1.3 统计学方法

以上实验均重复 3 次,定量数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,2 组间比较采用 student's *t* 检验,多组

之间比较采用方差分析,当  $P \leq 0.05$  时为差异有统计学意义。

## 2 结果

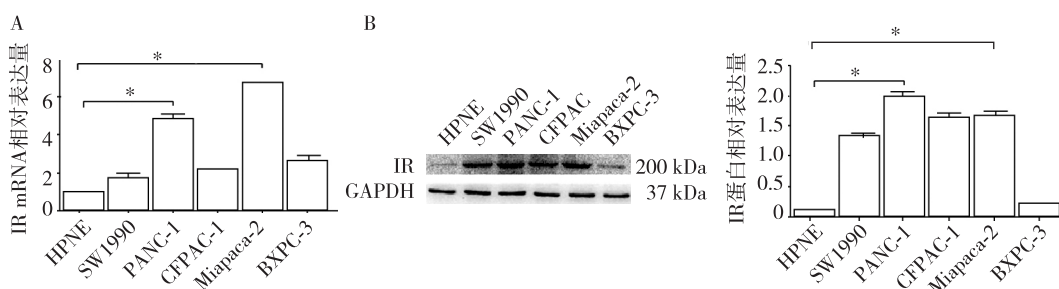
### 2.1 IR 的表达

提取各细胞株 RNA 及蛋白,RT-qPCR 和 Western blot 检测 IR 表达量,结果显示,相对正常导管上皮细胞 HPNE,IR 在胰腺癌细胞中高表达,其中以 PANC-1 和 Miapaca-2 表达量最高(图 1A、B),因此选

择这 2 株细胞用于后续实验。

### 2.2 最适胰岛素浓度的确定

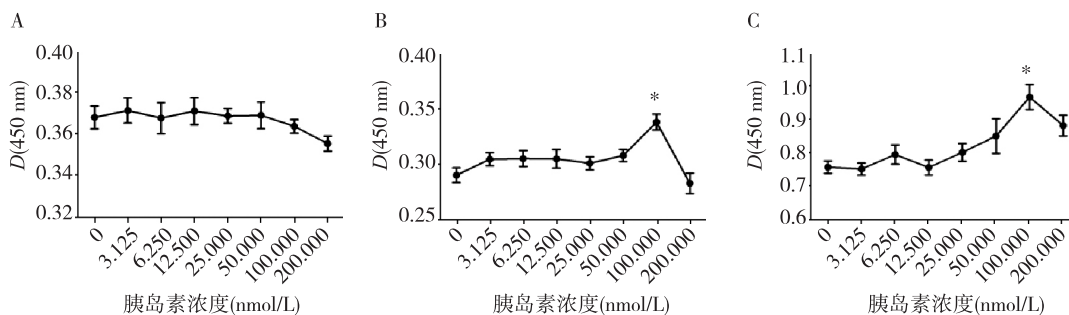
按照 3 000 个/孔将 HPNE、PANC-1、Miapaca-2 细胞接种于 96 孔板,CCK8 检测不同浓度胰岛素刺激 24 h 后,3 株细胞活性的改变,结果显示,不同浓度胰岛素对 HPNE 细胞活性无明显影响(图 2A);PANC-1 和 Miapaca-2 在胰岛素浓度为 100 nmol/L 时活性最强,为其最适工作浓度(图 2B、C)。在后续实验中,均采用这一浓度进行刺激。



A:RT-qPCR 检测 IR mRNA 表达量,两组比较,\* $P < 0.001$ ;B:Western blot 检测 IR 蛋白表达,两组比较,\* $P < 0.001$ 。

图 1 胰岛素受体在胰腺癌细胞株的表达

Figure 1 Expression of IR in pancreatic cancer cells



A:胰岛素刺激 24 h 后 CCK8 检测 HPNE 细胞活性;B:胰岛素刺激 24 h 后 CCK8 检测 PANC-1 细胞活性;C:胰岛素刺激 24 h 后 CCK8 检测 Miapaca-2 细胞活性;与胰岛素 0 nmol/L 的对照组比较,\* $P < 0.01$ 。

图 2 胰岛素的最适浓度

Figure 2 The optimum concentrate of insulin

### 2.3 胰岛素对胰腺癌细胞增殖能力的影响

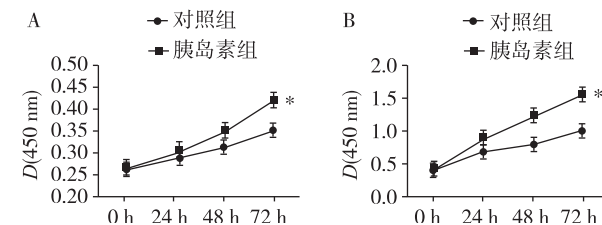
CCK8 检测 100 nmol/L 胰岛素刺激下,不同时间点(24、48、72 h)细胞活性的改变。结果显示,PANC-1 和 Miapaca-2 的活性在各时间点均明显增强(图 3A、B)。表明胰岛素可以促进 PANC-1 和 Miapaca-2 细胞的增殖。

### 2.4 胰岛素对胰腺癌细胞迁移与侵袭能力的影响

100 nmol/L 胰岛素刺激 PANC-1 和 Miapaca-2 细胞 48 h 后,Transwell 检测细胞迁移、侵袭能力的改变。结果显示,刺激后两株细胞的迁移能力明显增强(图 4A、B),侵袭能力也明显增强(图 4C、D)。

### 2.5 细胞株 MMP-2、MMP-7 和 MMP-9 蛋白的表达变化

先用 100 nmol/L 胰岛素刺激 PANC-1 和 Mia-



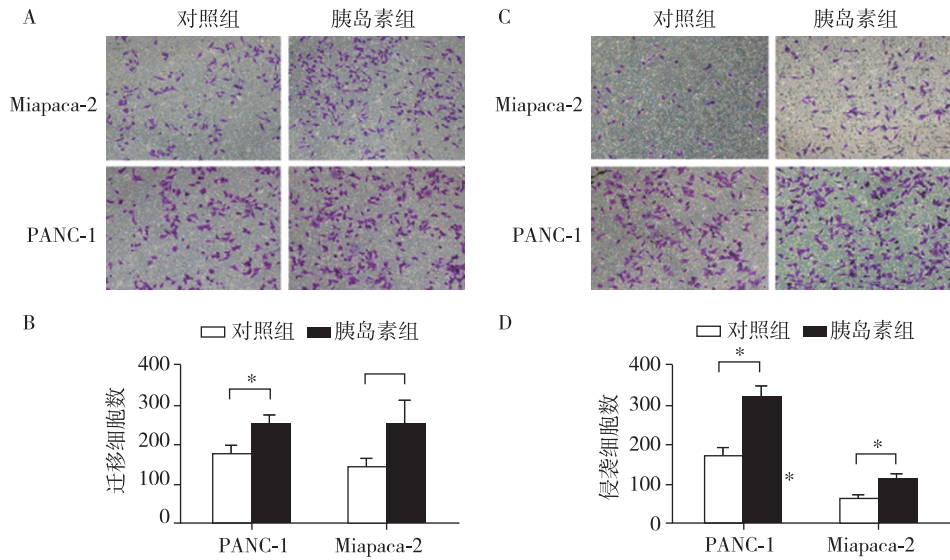
A:CCK8 检测 100 nmol/L 胰岛素刺激下 PANC-1 细胞活性;B:CCK8 检测 100 nmol/L 胰岛素刺激下 Miapaca-2 细胞活性;与对照组比较,\* $P < 0.01$ 。

图 3 胰岛素刺激下细胞增殖能力的变化

Figure 3 Proliferation changes of pancreatic cells under insulin stimulation

paca-2 细胞 48 h 后提取蛋白,Western blot 检测刺激后 MMP-2、MMP-7、MMP-9 的表达变化,结果显示胰

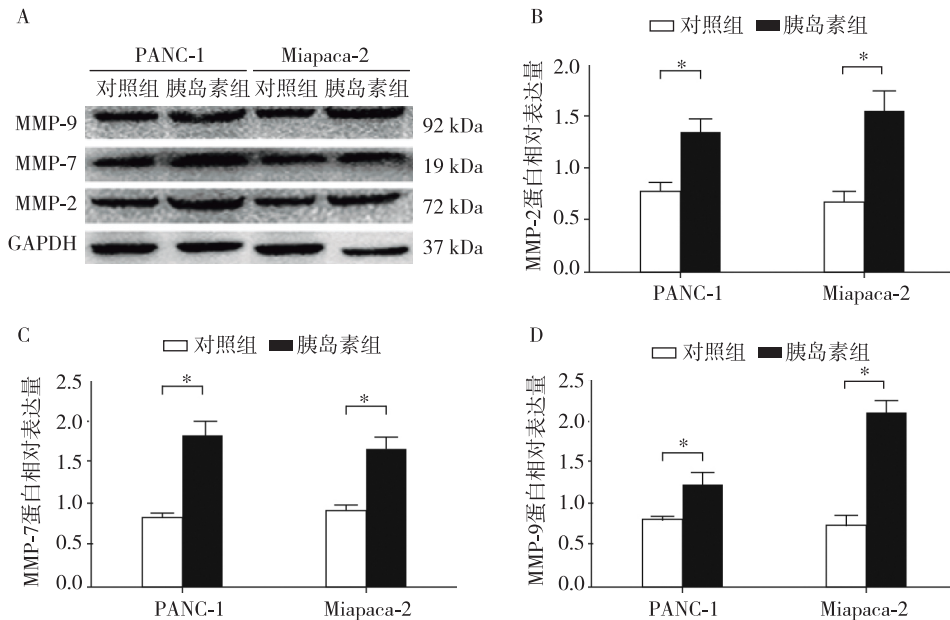
胰岛素刺激后细胞 MMP-2、MMP-7、MMP-9 蛋白表达水平明显高于对照组(图 5)。



A、B:Transwell 检测 100 nmol/L 胰岛素刺激 48 h 后细胞迁移能力;C、D:Transwell 检测 100 nmol/L 胰岛素刺激 48 h 后细胞侵袭能力;两组比较,\* $P<0.01$ 。

图 4 胰岛素刺激下细胞迁移、侵袭能力的变化

Figure 4 Invasion and migration changes of pancreatic cancer cells under insulin stimulation



A:100 nmol/L 胰岛素刺激 48 h 后,Westerh blot 检测 MMP-2、7、9 蛋白表达;B-D:MMP-2(B)、MMP-7(C)、MMP-9(D)蛋白表达的定量分析,两组比较,\* $P<0.01$ 。

图 5 胰岛素刺激下 MMP-2、7、9 的变化

Figure 5 Expression changes of MMP-2,7 and 9

### 3 讨论

胰岛素通过与外周器官中的 IR 结合实现其生理功能。当配体胰岛素与 IR 结合后,激活 IR 底物 1-4 (IRS1-4),进而可以激活下游 MAPK、PI3K/AKT 和 Jak/STAT3 等通路。在肿瘤细胞中,胰岛素/IR 轴

的激活能够促蛋白合成、促进增殖、抑制凋亡、促进血管生成以及参与肿瘤干细胞发生与维持等功能<sup>[7,14-15]</sup>。动物水平研究表明,降低小鼠体内胰岛素水平,或下调肿瘤 IR 水平可以抑制肿瘤生长、血管生成、淋巴管形成和迁移过程<sup>[16-17]</sup>。

本研究通过 RT-qPCR 和 Western blot 检测胰腺正常导管上皮及胰腺癌细胞 IR 表达,结果显示,胰腺癌细胞 IR 水平明显高于正常细胞,提示胰腺癌细胞对胰岛素可能更为敏感,胰岛素可能通过与胰腺癌细胞高表达的 IR 结合,促进肿瘤发展。对 IR 相对表达量较高的 PANC-1 和 Miapaca-2 进行实验的结果表明,胰岛素可以明显增强其活性、促进增殖。

作为肿瘤细胞的重要生物学特性,迁移、侵袭一直是恶性肿瘤相关研究的热点<sup>[18]</sup>。本研究 Transwell 实验结果显示,胰岛素刺激后胰腺癌细胞 PANC-1、Miapaca-2 的迁移、侵袭能力明显增强。MMP 是一类分解细胞外基质组分的锌蛋白酶,其异常表达与肿瘤细胞的迁移、侵袭密切相关<sup>[19]</sup>。有研究表明胰腺癌组织中高表达 MMP<sup>[20]</sup>,体外实验表明 MMP 可以促进胰腺癌细胞的增殖、迁移、侵袭能力<sup>[21]</sup>,一些细胞因子如黏蛋白,可以通过抑制 MMP 来发挥抑癌作用<sup>[22]</sup>。本研究发现胰岛素刺激后胰腺癌细胞 MMP-2、7、9 的蛋白表达量明显升高,提示胰岛素可能通过上述蛋白发挥促进肿瘤细胞迁移、侵袭的能力。

综上所述,本研究证实胰腺癌细胞相对正常导管上皮细胞高表达 IR。胰岛素刺激后,胰腺癌细胞的增殖、迁移、侵袭能力增强,其中 MMP-2、7、9 可能在迁移、侵袭中发挥重要作用。以上结果表明胰岛素与 IR 相互作用可能在胰腺癌的发展中发挥关键作用。

#### [参考文献]

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A, et al. Cancer statistics, 2016[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(1):7-30
- [2] Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, et al. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States [J]. Cancer Res, 2014, 74(11):2913-2921
- [3] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2):115-132
- [4] Kong B, Michalski CW, Erkan M, et al. From tissue turnover to the cell of origin for pancreatic cancer [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2011, 8(8):467-472
- [5] Ryan DP, Hong TS, Bardeesy N, et al. Pancreatic adenocarcinoma[J]. N Engl J Med, 2014, 371(22):2140-2141
- [6] Del Chiaro M, Segersverd R, Lohr M, et al. Early detection and prevention of pancreatic cancer: is it really possible today [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(34):12118-12131
- [7] Hua F, Yu JJ, Hu ZW. Diabetes and cancer, common threads and missing links [J]. Cancer Lett, 2016, 374(1): 54-61
- [8] Salvatore T, Marfella R, Rizzo MR, et al. Pancreatic cancer and diabetes: A two-way relationship in the perspective of diabetologist [J]. Int J Surg, 2015, 21 (Suppl 1): 72-77
- [9] Cui Y, Andersen DK. Diabetes and pancreatic cancer [J]. Endocr Relat Cancer, 2012, 19(5):F9-F26
- [10] Yuan C, Rubinson DA, Qian ZR, et al. Survival among patients with pancreatic cancer and long-standing or recent-onset diabetes mellitus [J]. J Clin Oncol, 2015, 33(1): 29-35
- [11] Chan MT, Lim GE, Skovs S, et al. Effects of insulin on human pancreatic cancer progression modeled *in vitro* [J]. BMC Cancer, 2014, 14:814
- [12] Zhang D, Cui L, Li SS, et al. Insulin and hypoxia-inducible factor-1 cooperate in pancreatic cancer cells to increase cell viability [J]. Oncol Lett, 2015, 10(3):1545-1550
- [13] Booy S, van Eijck CH, Janssen JA, et al. IFN- $\beta$  is a potent inhibitor of insulin and insulin like growth factor stimulated proliferation and migration in human pancreatic cancer cells [J]. Am J Cancer Res, 2015, 5(6):2035-2046
- [14] Pollak M. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia [J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8(12):915-928
- [15] Stoeltzing O, Liu W, Reinmuth N, et al. Regulation of hypoxia-inducible factor-1  $\alpha$ , vascular endothelial growth factor, and angiogenesis by an insulin-like growth factor-I receptor autocrine loop in human pancreatic cancer [J]. Am J Pathol, 2003, 163(3):1001-1011
- [16] Fierz Y, Novosyadlyy R, Vijayakumar A, et al. Insulin-sensitizing therapy attenuates type 2 diabetes-mediated mammary tumor progression [J]. Diabetes, 2010, 59(3): 686-693
- [17] Zhang H, Fagan DH, Zeng X, et al. Inhibition of cancer cell proliferation and metastasis by insulin receptor downregulation [J]. Oncogene, 2010, 29(17):2517-2527
- [18] Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade [J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4(6):448-456
- [19] Deryugina EI, Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis [J]. Cancer Metastasis Rev, 2006, 25(1): 9-34
- [20] Bramhall SR, Stamp GW, Dunn J, et al. Expression of collagenase(MMP2), stromelysin(MMP3) and tissue inhibitor of the metalloproteinases(TIMP1) in pancreatic and ampullary disease [J]. Br J Cancer, 1996, 73(8):972-978
- [21] Grunwald B, Vandooren J, Gerg M, et al. Systemic ablation of MMP-9 triggers invasive growth and metastasis of pancreatic cancer via deregulation of IL-6 expression in the bone marrow [J]. Mol Cancer Res, 2016, 14(11):1147-1158
- [22] Shen M, Wu MY, Chen LP, et al. Cantharidin represses invasion of pancreatic cancer cells through accelerated degradation of MMP2 mRNA [J]. Sci Rep, 2015, 5:11836

[收稿日期] 2017-03-11