DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.06.010

Let-7a 下调 k-Ras 和 c-Myc 癌基因的表达抑制肾癌细胞增殖

吴银霞 [1] 王业华 [2] 齐小康 [2] 顾沈阳 [2] 俞俊杰 [2△]

(1 扬州大学临床医学院肿瘤科 江苏 扬州 225001;2 扬州大学临床医学院泌尿外科 江苏 扬州 225001)

摘要 目的: MicroRNA 是近年发现的一类单链小分子 RNA,对它的研究已成为一个新的热点。最近的研究发现,let-7a 在细胞内影响着基因的表达调控,在疾病发生中起着及极重要的作用,尤其是在肿瘤的发展过程中,let-7a 扮演着不可替代的角色。本文主要研究 let-7a 在肾癌细胞株中的表达情况及其调控的靶基因、抑制细胞增殖的机制,对探索肾癌的致病基因,寻求肾癌新的治疗途径有重要意义。**方法:**应用化学合成的 let-7a 模拟物(mimics)用脂质体 Lipofectamine 2000 在体外瞬时转染 786-O 和 Caki-1 肾癌细胞株,转染 48 小时后采用荧光定量 RT-PCR 的方法检测 let-7a 及 c-Myc、k-Ras mRNA 的表达情况,Western blot 检测这两株肾癌细胞转染了 let-7a mimics 后 c-Myc 及 k-Ras 蛋白的表达变化; 转染 let-7a mimics 后分别在 24、48、72 小时三个时间点用 CCK-8 试剂盒检测对肾癌细胞株增殖的影响。**结果:**786-O 和 Caki-1 肾癌细胞株中 let-7a 的表达量明显低于正常肾小管上皮细胞株 HK-2($P<0.05$); 转染了 let-7amimics 的 786-O 和 Caki-1 肾癌细胞株,RT-PCR 及 Western blot 结果显示 c-Myc、k-Ras 在基因及蛋白的表达水平明显下调($P<0.05$);CCK-8 检测结果显示转染了 let-7a mimics 的肾癌细胞株细胞增殖能力明显明显受到抑制,与阴性对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论:** Let-7a 在在肿瘤细胞与正常细胞中存在明显差异,let-7a 通过调控 c-Myc、k-Ras 的表达能抑制肾癌细胞增殖。Let-7a mimics 可以抑制肾癌细胞的增殖,因此上调 Let-7a 的表达有可能成为肾癌基因治疗的一种有效治疗手段。

关键词: Let-7a;KRAS;c-myc;肾细胞癌;细胞增殖

中图分类号:R737.11 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)06-1036-04

Let-7a Inhibits the Proliferation in Renal Cell Carcinoma Cell Lines by Regulating k-Ras and c-Myc Gene Expression

WU Yin-xia[1], WANG Ye-hua[2], QI Xiao-kang[2], GU Shen-yang[2], YU Jun-jie[2△]

(1 Department ofOncology, Clinical Medical College of Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, 225001, China;

2 Department of urology, Clinical Medical College of Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, 225001, China)

ABSTRACT Objective: MicroRNA is a type of the single small RNA discovered in recent years, and the study of it has become a new hot spot. Let-7a plays a very important role and affects the expression of genes in cells. Especially let-7a plays an irreplaceable role in the process of tumor development.This article mainly researches the expression of let-7a in kidney cancer cell lines and regulation of target genes and the mechanism of inhibition of cell proliferation. It is a great significance to explore the pathogenic genes and new treatment approaches in kidney cancer. **Methods:** Application of chemical synthesis of the let-7a mimics with Lipofectamine 2000 transient transfects in 786-O and Caki-1 kidney cancer cell lines was taken. The let-7a and c-Myc, k-Ras mRNA expressions were detected with method of RT-PCR after transfection. The expression changeswere tested with Western blot. Effects of let-7a in cell proliferation were evaluated by CCK-8 assay. **Results:** Transfection of the let-7amimics in Cak-i and 786-Orenal cancer cell lines, that the c-Myc, k-Ras gene and protein expression level significantly reduced($P<0.05$). The expression levels of let-7a in 786-O and Caki-1 ells were lower than normal renal tubular epithelial cell lines HK-2 ($P<0.05$). Over-expression of let-7a in 786-O and Caki-1 cells suppressed c-Myc, k-Ras gene and protein level. The result showed by RT-PCR and Western blot ($P<0.05$). CCK-8 test results showed that transfection let-7a mimics inhibit their proliferation ability was significantly suppressed compared with negative control group($P<0.05$). **Conclusion:** These findings suggest that Let-7a plays an important role in kidney cancer cell lines proliferation through suppressing c-Myc, k-Ras *in vitro*, which provides a potential development of a new approach for the treatment of renal cancer.

Key words: Let-7a; K-Ras; C-Myc; Renal cell cancer; Cell proliferation

Chinese Library Classification: R737.11 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2014)06-1036-04

前言

MicroRNA (miRNA) 是一类真核生物内源性小分子单链 RNA,长 18-26 个核苷酸,能够通过与靶 mRNA 特异性的碱基配对引起靶 mRNA 的降解或者翻译抑制,对基因进行转录后表达的调控,在肿瘤的增殖、侵袭和转移中发挥重要的作用[1]。肾透明细胞癌发生发展的分子生物学机制尚未完全清楚,探索肾癌的致病基因对于了解肾癌的发病机制有重要意义。最近的研究发现,Let-7a 在细胞内影响着基因的表达调控,在疾病发

作者简介:吴银霞(1981-),女,硕士研究生,医师,主要研究方向:miRNA 与泌尿系统肿瘤

△通讯作者:俞俊杰,电话:0514-87373136,

E-mail: urologistyjj@163.com

(收稿日期:2013-05-23 接受日期:2013- 06-17)

生过程中起着及其重要的作用，尤其是在肿瘤的发展过程中，let-7a 扮演着不可替代的角色。Let-7a 在肿瘤细胞与正常细胞中存在明显差异,因此 let-7a 在肿瘤早期诊断方面可能有重要意义。研究证实 let-7a 参与细胞分化、增殖和凋亡、个体发育、机体代谢以及病毒感染过程 _ENREF_2,并且在多种肿瘤中扮演重要的角色。Let-7a 的表达水平在肺癌、卵巢癌、乳腺癌等多种肿瘤细胞中显著下调,而且肺癌和乳腺癌中 let-7a 的表达水平与患者的生存时间呈正相关。本研究运用实时定量 PCR、Western-blot、CCK-8 等实验证实 Let-7a 在肾癌细胞株中低表达,上调 let-7a 后能靶向调控癌基因 k-Ras、c-Myc,从而抑制肾癌细胞的增殖,为肾癌新的靶向治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 正常肾小管上皮细胞 HK-2、人肾癌细胞株 786-O 和 Caki-1 购自中国科学院上海细胞研究所细胞库。RT-PCR 试剂盒购自大连 takara 公司。MicroRNA let-7a mimics 购自上海杰玛生物公司。CCK-8(Cell Counting Kit-8)试剂盒购自碧云天公司。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 按照 TRIZOL 法提取细胞总 RNA,应用紫外分光光度计测定 RNA 在 A260/A280 的比值即 RNA 纯度,比值范围 1.8 到 2.1。用逆转录试剂盒将 mRNA 反转录为 cDNA,采用实时荧光定量 PCR 检测肾癌细胞中 k-Ras 及 c-Myc 基因的表达,GAPDH 基因作为内参。SYBR Green PCR 试剂盒实时荧光定量 PCR 检测 Let-7a 表达,设 U6 为内参。目的基因相对于内参基因的表达量用 2-Δ Ct 表示。

1.2.2 瞬时转染 转染前 24 小时，将对数生长期的肾癌细胞株以 1.0× 10^5 个 / 孔接种于 6 孔板中,24 小时后当细胞融合达到 50 % 进行转染。先用无双抗和血清的 OPti-MEM 培养基分别稀释 let-7a mimics 分子和 LiPofectamine 2000 转染试剂，5min 后将两者混合,室温孵育 20 分钟。去除培养板内的培养基，用无双抗及血清的培养基洗 2 次，然后加入孵育的 let-7a mimics 和 LiPofectamine 2000 转染试剂混合物。let-7a mimics 终浓度为 80 nmol·L^{-1},培养 48 小时后收集细胞,提取 RNA 及蛋白进行相关实验。

1.2.3 Western blot 检测 k-Ras 及 c-Myc 蛋白的表达 瞬时转染 48 h 后,用含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液抽提蛋白,蛋白抽提完成后按照 BCA 蛋白浓度检测方法进行总蛋白含量的测定。蛋白进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),电泳完成后将印迹转染 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉 TBST 溶液封闭,清洗,一抗杂交 4 ℃过夜,洗膜,二抗杂交,在暗室中 ECL 试剂显色,X 光黑白胶片曝光,显影。

1.2.4 体外细胞增殖实验 CCK-8（Cell Counting Kit-8）实验 细胞融合 60～70 % 时，消化重悬细胞调整细胞浓度，以每孔 3000 个细胞接种于 96 孔板，置于 37 ℃ ,5 % CO_2 恒温培养箱内培养。转染培养 6h 后更换含有 10 % 胎牛血清及双抗的 1640 培养基继续培,分别在 24 h,48 h,72 h 三个时间点检测细胞增殖情况。96 孔板内每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,细胞培养箱中继续培养 2 h 后,酶标仪检测各孔光密度值(检测波长 450 nm),记录结果并绘制生长曲线。

1.3 统计学方法

采用统计软件 SPSS 17.0 进行统计。数据用均数± 标准差表示，两样本均数比较采用双侧 t 检验,P<0.05 被认为有统计学意义。

2 结果

2.1 Let-7a 在细胞株中的表达情况

Let-7a 在 786-O 和 Caki-1 细胞中的表达明显低于 HK-2 正常肾小管上皮细胞株(*P<0.05,图 1)。

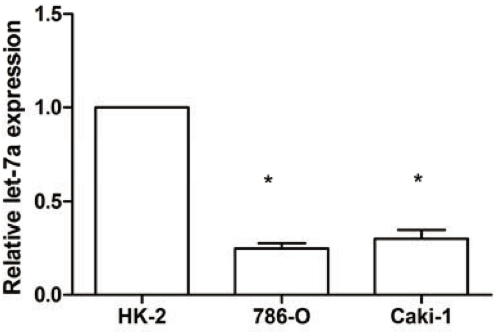

图 1 肾癌细胞中 let-7a 的表达与 HK-2 细胞比较 *P<0.05

Fig.1 The expression level of let-7a in renal cell carcinoma cells vs HK-2 *P<0.05

2.2 Let-7a mimics 转染 786-O 和 Caki-1 细胞后 Let-7a、KRAS 和 c-myc mRNA 水平的表达

肾癌细胞株 786-O 和 Caki-1 转染 Let-7a mimics 及阴性对照后，细胞内 let-7a 的表达水平明显比阴性对照组高(P<0.05,图 2A)。k-Ras 和 c-Myc 是 let-7a 的靶基因,在 786-O 和 Caki-1 肾癌细胞株中上调 let-7a 后 c-Myc 和 k-Ras 在 mRNA 水平上下降(P<0.05,图 2B,2C)。

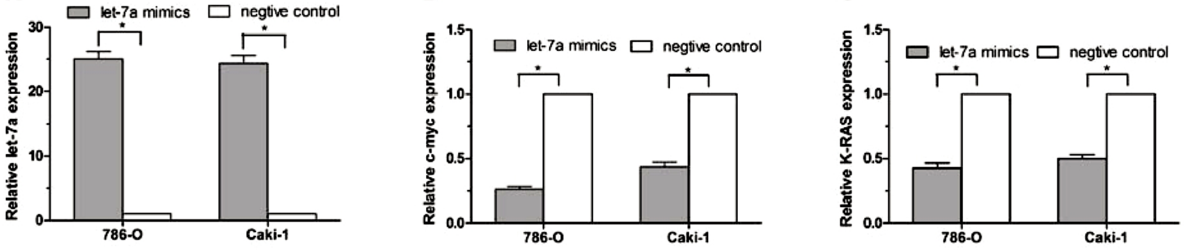

图 2 转染了 let-7a mimics 后 let-7a、c-Myc、k-Ras mRNA 的表达(*P<0.05)A：let-7a 表达;B：c-Myc mRNA 表达;C：k-Ras mRNA 表达

Fig.2 The expression levels of let-7a，c-mMyc mRNA，k-Ras mRNA after transfection of let-7a mimics(*P<0.05)A: Exprssion of let-7a; B: Exprssion of c-Myc mRNA; C: Exprssion of k-Ras mRNA

2.3 上调 let-7a 后 western-blot 检测 c-Myc、k-Ras 蛋白表达变化

_ENREF_3 上调肾癌细胞株 786-O 和 Caki-1 中 Let-7a 的表达量后，Let-7a 下游的靶基因 c-Myc、k-Ras 在蛋白水平发生下调(图 3)，说明 let-7a 能调控癌基因 c-Myc、k-Ras 的表达。

2.4 CCK-8 检测细胞增殖

CCK-8 检测细胞增殖实验发现，转染了 let-7a mimics 的肾癌细胞株 786-O 和 Caki-1，细胞增殖较对照组明显受到了抑制。抑制效率在 72 小时表现最明显(P<0.05，图 4)。

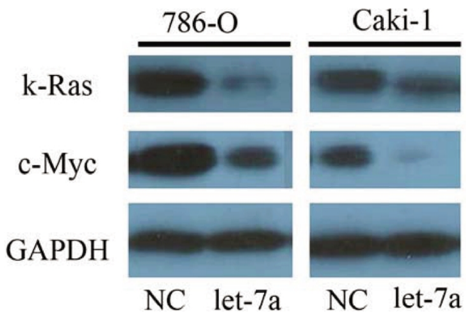

图 3 转染了 let-7a mimic 后 k-Ras、c-Myc 蛋白水平的变化

Fig.3 The expression levels of c-Myc mRNA，k-Rasprotein after transfection of let-7a mimics(*P<0.05)

3 讨论

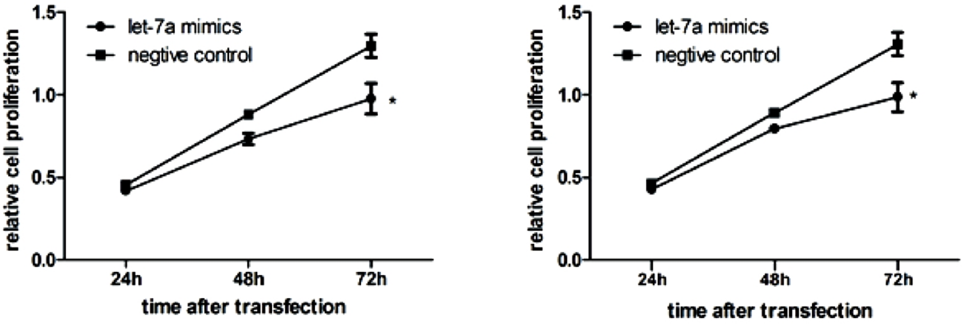

图 4 转染 let-7a mimics 后对 786-O 和 Caki-1 细胞增殖的影响(* P<0.05)

Fig.4 The effect on cell proliferation in cells of 786-O and Caki-1after transfection of let-7a mimics(* P<0.05)

miRNA 是一类内源性、广泛存在于真核生物中，是一组不编码蛋白质的短序列 RNA，作为新近发现的转录后调控的重要分子，广泛参与生命活动中的一系列重要进程，如: 生物进化与发育，细胞分化与恶变，细胞增殖与凋亡等，它通过与其目标 mRNA 分子的 3' 端非编码区域互补导致该 mRNA 分子的翻译受到抑制，在调控基因表达和肿瘤的发生、发展中发挥重要作用[2,3]。miRNA 在许多肿瘤中存在异常表达或突变现象，研究发现 50 % 以上的微 RNA (miRNA) 基因定位于与肿瘤相关的区域，而且多种肿瘤中均存在 miRNA 异常表达，推测它们可能起到原癌基因和抑癌基因的作用，参与了人类肿瘤的发生和发展[4]。大量的研究表明，癌症的生物学行为与 miRNA 对致癌和抑癌基因的调控有关，因此 miRNA 在恶性肿瘤的发病机制、早期诊断以及寻找新的治疗策略的研究中意义重大[3,5]。

Let-7a 作为一种抑癌基因在肺癌[6]、乳腺癌[7]、前列腺癌[8]中表达显著下调。Let-7a 可以通过下调 k-RAS 及 HMGA2 基因的表达，抑制肺癌细胞的侵袭及增殖，研究证实 Let-7 低表达的肺癌患者复发时间短，预后不良[9]。将 Let-7a 构建到 A549 肺癌细胞株中，通过皮下种植，尾静脉注射接种小鼠体内，结果发现 let-7a 能抑制肺癌的生长及转移[10]。Dong 等人发现 let-7a 能够在体内及体外通过靶向 E2F2 及 CCND2 基因，从而抑制前列腺癌细胞的增殖[11]。在鼻咽癌中，Let-7a 靶向作用 EZH2 基因，抑制肿瘤细胞的增殖，促进细胞凋亡[12]。本研究发现 let-7a 在肾细胞癌中低表达，进一步研究发现上调肾癌细胞中 let-7a 的表达水平可以导致细胞中的癌基因 k-Ras 及 c-Myc 在 mRNA 和蛋白水平表达下调，从而抑制了细胞的增殖，表明 let-7a 在肾癌细胞增殖过程中起关键的抑制作用。肾癌组织中 c-Myc 及 k-Ras 蛋白较正常组织显著高表达，let-7a 则显著缺乏。在正常细胞中 let-7a 的水平较高，c-Myc 及 k-Ras 蛋白表达受抑制，而肿瘤细胞中 let-7a 水平很低甚至缺失，c-Myc 及 k-Ras 基因失控，其蛋白过量表达，引起了细胞的恶性增殖。Let-7a 能通过其种子序列与 k-Ras 及 c-Myc 的 mRNA 3'UTR 区域结合，导致 k-Ras 及 c-Myc 基因在转录后水平被调控，他们的下游基因如：CCND1、PCNA 也受到了抑制，从而使细胞周期停滞，肾癌细胞增殖受到抑制。

c-Myc 属于 myc 癌基因家族，编码核内 DNA 结合蛋白，可直接调节其它基因的转录，在促进细胞增殖、生长和抑制细胞凋亡过程中具有重要作用，c-Myc 表达和功能失调是人类恶性肿瘤中最为常见的异常[13]。c-Myc，n-Myc, v-Myc 是 Myc 家族的成员，这些癌基因在多种肿瘤中过表达[14]。c-Myc 在肾细胞癌中的信号通路被激活对促进肾癌细胞的增殖是一个重要条件的[15]。c-Myc 能被多个 miRNA 所调控，miR-135a、miR-34a 在肾癌中也扮演肿瘤抑制基因的角色，能靶向 c-Myc 抑制细胞的增殖效应[16,17]。本研究发现肾癌细胞株中 c-My 表达上调，激活了 c-Myc 促细胞增殖的信号通路。Let-7a 靶向抑制 c-Myc 使 c-Myc 所激活的细胞增殖信号通路失活。K-Ras 是信号通路 EGFR/RAS/MAPK 中的关键分子，对肿瘤细胞增殖、迁移中发挥重要作用[18]。研究表明活化后的 k-Ras 基因与 PI3K 相互作用能上调其下游的靶基因 CCND1 的活化，进而促进细胞的增殖[19]。k-Ras 基因在肾癌组织中高表达并与肾癌病人的生存率成负相关[20]。本实验发现 let-7a 可以调控 c-Myc 及 k-Ras 的表达导致肾癌细胞的增殖减慢，抑制了 c-Myc 及 k-Ras 信号通路的激活，导致细胞周期停滞。

本实验我们得到如下的结论：Let-7a 在肾癌细胞株中表达显著下调，将 let-7a mimics 瞬时转染肾癌细胞株后，获得了 let-7a 的过表达。Let-7a 通过与靶癌基因 c-Myc、k-Kas 的 3'UTR 区域结合，在转录后水平调控 c-Myc、k-Kas 基因，及蛋白表达水平明显下调，进而影响肾癌细胞的增殖。Let-7a 在肾癌组织中 Let-7 表达的高低与肾癌患者预后的关系，let-7a 对肾癌的早期诊断是否有帮助？这是我们需要进一步探究的内容。所以我们认为 Let-7a 抑制肾癌细胞增殖，增进人们对肾癌发生机制的了解，并为攻克肾癌打下坚实的基础，有望成为治疗肾癌的一种新策略。

参 考 文 献(References)

[1] Cho WC. MicroRNAs: potential biomarkers for cancer diagnosis, prognosis and targets for therapy [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2010, 42(8): 1273-1281

[2] Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, et al. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels[J]. Nature, 2010, 466 (7308): 835-840

[3] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell, 2009, 136(2): 215-233

[4] Fletcher CE, Dart DA, Sita-Lumsden A, et al. Androgen-regulated processing of the oncomir miR-27a, which targets Prohibitin in prostate cancer[J]. Hum Mol Genet, 2012, 21(14): 3112-3127

[5] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297

[6] Heegaard NH, Schetter AJ, Welsh JA, et al. Circulating micro-RNA expression profiles in early stage nonsmall cell lung cancer [J]. Int J Cancer, 2012, 130(6): 1378-1386

[7] Davoren PA, McNeill RE, Lowery AJ, et al. Identification of suitable endogenous control genes for microRNA gene expression analysis in human breast cancer[J]. BMC Mol Biol, 2008, 9(76): 1471-1476

[8] Wang M, Hu Y, Amatangelo MD, et al. Role of ribosomal protein RPS2 in controlling let-7a expression in human prostate cancer[J]. Mol Cancer Res, 2011, 9(1): 36-50

[9] Voortman J, Goto A, Mendiboure J, et al. MicroRNA expression and clinical outcomes in patients treated with adjuvant chemotherapy after complete resection of non-small cell lung carcinoma [J]. Cancer Res, 2010, 70(21): 8288-8298

[10] He Xiao-yan, Chen Jun-xia, Zhang Zheng, et al. The let-7a microRNA protects from growth of lung carcinoma by suppression of k-Ras and c-Myc in nude mice [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2010, 136(7): 1023-1028

[11] DONG Qing-chuan, WANG Tao, QIN Wei-wei, et al. MicroRNA Let-7a Inhibits Proliferation of Human Prostate Cancer Cells In Vitro and In Vivo by Targeting E2F2 and CCND2 [J]. PLoS One, 2010, 5 (4): 1371-1378

[12] Cai K, Wan Y, Sun G, et al. Let-7a inhibits proliferation and induces apoptosis by targeting EZH2 in nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Oncol Rep, 2012, 28(6): 2101-2106

[13] Eilers M, Eisenman RN. Myc's broad reach [J]. Genes Dev, 2008, 22 (20): 2755-2766

[14] Vita M, Henriksson M. The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer[J]. Semin Cancer Biol, 2006, 16(4): 318-330

[15] Tang SW, Chang WH, Su YC, et al. MYC pathway is activated in clear cell renal cell carcinoma and essential for proliferation of clear cell renal cell carcinoma cells[J]. Cancer Lett, 2009, 273(1): 35-43

[16] Yamada Y, Hidaka H, Seki N, et al. Tumor-suppressive microRNA-135a inhibits cancer cell proliferation by targeting the c-MYC oncogene in renal cell carcinoma[J]. Cancer Sci, 2013, 104(3): 304-312

[17] Yamamura S, Saini S, Majid S, et al. MicroRNA-34a suppresses malignant transformation by targeting c-Myc transcriptional complexes in human renal cell carcinoma [J]. Carcinogenesis, 2012, 33 (2): 294-300

[18] Corkery B, Crown J, Clynes M, et al. Epidermal growth factor receptor as a potential therapeutic target in triple-negative breast cancer[J]. Ann Oncol, 2009, 20(5): 862-867

[19] Miller KA, Yeager N, Baker K, et al. Oncogenic Kras requires simultaneous PI3K signaling to induce ERK activation and transform thyroid epithelial cells in vivo[J]. Cancer Res, 2009, 69(8): 3689-3694

[20] Kamai T, Arai K, Koga F, et al. Higher expression of K-ras is associatedwith parathyroid hormone-related protein-induced hypercalcaemia in renal cell carcinoma[J]. BJU Int, 2001, 88(9): 960-966

(上接第 1024 页)

[20] Zhang XM, Li L, McNaughton PA. Proinflammatory Mediators Modulate the Heat-Activated Ion Channel TRPV1 via the Scaffolding Protein AKAP79/150[J].Neuron, 2008, 59(3):450-461

[21] Schnizler K, Shutov LP, Van Kanegan MJ, et al. Protein kinase A anchoring via AKAP150 is essential for TRPV1 modulation by forskolin and prostaglandin E2 in mouse sensory neurons [J]. J Neurosci, 2008, 28(19):4904-4917

[22] Vetter I, Wyse BD, Monteith GR, et al. The μ opioid agonist morphine modulates potentiation of capsaicin-evoked TRPV1 responses through a cyclic AMP-dependent protein kinase A pathway [J]. Molecular Pain, 2006, 2:22