

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.21.005

MicroRNA-145 在肾癌中的临床意义及其分子机制探讨*

莫 仁 彭景涛 马 坚 张长存 阮 渊 刘永超 周立斌 尹冰德 凡 杰[△]

(上海交通大学附属第一人民医院泌尿外科 上海 200080)

摘要 目的:探讨 miRNA-145 在肾癌中的临床意义及其分子机制。**方法:**通过实时定量 PCR 检测和比较 16 例肾癌患者的肿瘤组织及癌旁正常肾组织中 miRNA-145 的表达,并分析 miRNA-145 的表达水平与肾癌患者病理特征及临床分级的相关性。进一步采用实时定量 PCR 检测和比较肾癌细胞株 786-O、769P 及正常肾细胞株 HK2 中 miRNA-145 表达量;通过转染 miRNA-145 mimics 和阴性对照 miRNA 至 769P、786-O 肾癌细胞株后观察癌基因(bcl-2、e2f3、cdk6、ccnd1)mRNA 的表达。**结果:**肾癌组织中 miRNA-145 的表达显著低于癌旁正常肾组织 ($P<0.05$), 且与肾癌的直径、病理核分级及临床分级呈显著负相关 ($P<0.05$)。肾癌细胞株 769P、786-O 中 miRNA-145 的表达显著低于正常 HK-2 肾细胞($P<0.05$), 而转染 miRNA-145 mimics 的 769P、786-O 细胞中多个癌基因(bcl-2、e2f3、cdk6、ccnd1)的 mRNA 表达均较阴性对照组显著降低($P<0.05$)。**结论:**miRNA-145 在肾癌中呈低表达,可能通过调控多个癌基因的表达在肾癌的发生发展过程中发挥重要的作用。

关键词: 肾癌;miRNA-145;癌基因;基因表达

中图分类号: R730.231;R737.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)21-4018-04

Clinical Significance and Molecular Mechanism of MicroRNA-145 in Renal Cell Carcinoma*

MO Ren, PENG Jing-tao, MA Jian, ZHANG Chang-cun, RUAN Yuan, LIU Yong-chao, ZHOU Li-bin, YIN Bing-de, FAN Jie[△]

(Department of Urology, Shanghai First People's Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 200080, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the clinical significance and molecular mechanism of miRNA-145 in renal cell carcinoma (RCC). **Methods:** Quantitative real time PCR was used to examine and compare the miRNA-145 expression in 16 cases of RCC and adjacent normal renal tissues, and further in RCC cell lines 786-O, 769P and normal HK2 cell lines. The correlation of miRNA-145 expression with clinicopathological characteristics and clinical grading were analyzed. After being transfected with the miRNA-145 mimics, the expression levels of multiple oncogenes (bcl-2, e2f3, cdk6, ccnd1) in RCC cell lines 786-O, 769P and normal HK2 cell line were examined by QRT-PCR. **Results:** The miRNA-145 expression was downregulated in RCC tissue in comparison with that in the normal renal tissue ($P<0.05$), which was negatively correlated with the diameter, pathological nuclear grading and clinical grading of RCC ($P<0.05$). The miRNA-145 expression was significantly lower in RCC cell lines 786-O, 769P than that in the normal HK2 cell line ($P<0.05$). The overexpression of miRNA-145 in 786-O, 769P cells significantly decreased the mRNA expression of multiple oncogenes (bcl-2, e2f3, cdk6, ccnd1) ($P<0.05$). **Conclusion:** MiRNA-145 was downregulated in RCC, and may play an important role in the renal carcinogenesis through regulating multiple oncogenes.

Key words: Kidney cancer; MiRNA-145; Oncogene; Gene Expression

Chinese Library Classification: R730.231; R737.11 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)21-4018-04

前言

肾癌占成人恶性肿瘤的 3%-5%, 其发病率近年呈逐年上升趋势^[1]。由于肾癌的早期临床特征不明显,约 30%患者在明确诊断时已发生远处转移,30%局限性肾癌在进行肾脏切除后还会复发和远处转移^[2]。此外,肾癌是对传统化疗药物“先天性”不敏感的一类肿瘤^[3],靶向药物治疗虽然具有一定的临床疗效,但是很少能达到完全缓解,且治疗 6~15 月后患者会产生耐药^[4]。

miRNA 是一簇长约 22 nt 的小分子非编码单链 RNA,能

与靶基因 mRNA 的 3'-UTR 互补结合,通过促进靶 mRNA 降解,在转录后水平抑制靶基因表达,参与调控细胞周期、细胞生长、凋亡、分化和应激反应等一系列生物过程^[5]。miRNA 的表达异常与肿瘤发生、发展和转移密切相关。miRNA-145 作为抑癌基因,可抑制肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移^[6]。目前,已有研究证实 miRNA-145 在多种肿瘤中表达下调,包括前列腺癌、膀胱癌、结肠癌、卵巢癌、食管癌等^[7-11]。最近,有研究报道 miRNA-145 在肾癌中的表达下调,并与肾癌术后早期复发密切相关^[12,13]。本研究旨在进一步探讨 miRNA-145 在肾癌发生发展中

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81372753);上海市科学技术委员会医学引导项目(124119a2200)

作者简介:莫仁(1984-),男,硕士研究生,主要从事微创泌尿外科及泌尿系统肿瘤的研究, E-mail: moren325@163.com

△ 通讯作者:凡杰,电话:021-63241377, E-mail: jief67@sina.com

(收稿日期:2014-02-15 接受日期:2014-03-12)

的潜在分子机制,从而为肾癌新的诊断和治疗策略提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 病例及组织标本的收集与保存

2012年8月至2013年8月于上海交通大学附属第一人民医院收集的16例肾癌根治术、肾癌部分切除术后肾癌组织及同一患者的正常肾组织。每一例肾癌组织均经上海市第一人民医院病理科同一医生进行病理诊断、分期及核分级分析。同时收集患者的年龄、性别、手术方式、肿瘤大小等相关临床资料。标本的收集经伦理委员会认可。标本收集后采用冻存管保存于液氮中直至RNA提取。

1.2 RNA的提取及cDNA的合成

组织RNA的提取及cDNA的合成:将液氮保存的约0.2g组织使用冰冻切片切至10 μm薄片,再用匀浆机匀浆。采用mir-VANA miRNA Isolation Kit(Ambion, Austin, TX)试剂盒处理总RNA,使用TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit(Ambion)试剂盒将10 ng纯化的RNA特异性逆转录miR-145及内参U6 snRNA相对应的cDNA,反应体系为15 μL,包含master mix 7 μL、特异性逆转录引物 primer 3 μL及总RNA模板5 μL。所逆转的cDNA即时进行Real-time PCR检测。

细胞RNA的提取及cDNA的合成:采用Trizol(Invitrogen)法提取细胞的总RNA,1%琼脂糖凝胶电泳鉴定RNA的纯度,同时分光光度计在260 nm处测量RNA的浓度。

1.3 细胞培养

人肾癌细胞株786-O来自中国科学院上海细胞研究所细胞库,769P细胞株购自美国ATCC。首先37℃水浴复苏786-O、769P细胞,然后接种于10 cm培养皿中,两种细胞培养

均使用含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基(hyclone),细胞培养在37℃,饱和湿度5% CO₂的培养箱中。细胞传代时,用0.25%胰蛋白酶(含有0.02%的EDTA)消化贴壁细胞,将培养皿置入培养箱中孵育1分钟左右;含有10%新生胎牛血清培养液停止消化,4℃温度,1000 rpm的转速,离心3 min后加培养皿传代至新的培养皿中。

1.4 细胞转染

分别用阴性对照组 negative control(NC)和miR-145mimics干扰组(M)转染两个细胞株。首先在6孔板中铺1×10⁵个细胞,然后采用转染试剂脂质体Lipofectamin RNAiMAX(Invitrogen)将阴性对照(negative control)组和miR-145 mimics(GenePharma)以50 nm的浓度导入769P、786-O细胞中,转染48小时后收集细胞,提取RNA进行检测。

1.5 Quantitative real-time PCR(qRT-PCR)检测

使用Taqman miRNA试剂盒(Applied Biosystems)定量检测miRNA-145,以RNU6B作为内参基因。使用Prime-Script Reverse Transcription System试剂盒(TAKARA)检测癌基因的表达,以GAPDH作为内参基因。

1.6 统计学分析

采用SPSS17.0统计学软件中两组独立样本t检验进行统计分析,以P<0.05为差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 miRNA-145在肾癌组织中的表达

通过qRT-PCR检测16例肾癌组织及配对正常肾组织标本中miRNA-145表达量,结果显示肾癌组织内miRNA-145的表达较正常肾组织显著降低(P<0.05)(见表1,图1)。

表1 miRNA-145的表达与肾癌患者病理特征及临床分级之间的相关性

Table 1 Correlation of miRNA-145 expression with the pathological characteristics and clinical grading of patients with renal cell carcinoma

Clinical characteristics	case	Relative expression of miR-145		
		up	down	P
Age				<0.05
≤ 60	9	1	8	
≥ 60	7	2	5	
Sex				
female	3	0	3	
male	13	3	10	
Diameter				<0.05
<4cm	5	3	2	
>4cm	11	0	11	
Nuclear grade				<0.05
1	0	0	0	
2	13	0	13	
3	3	2	1	
Stage of TNM				<0.05
I	15	15	0	
II	1	1	0	
III	0	0	0	

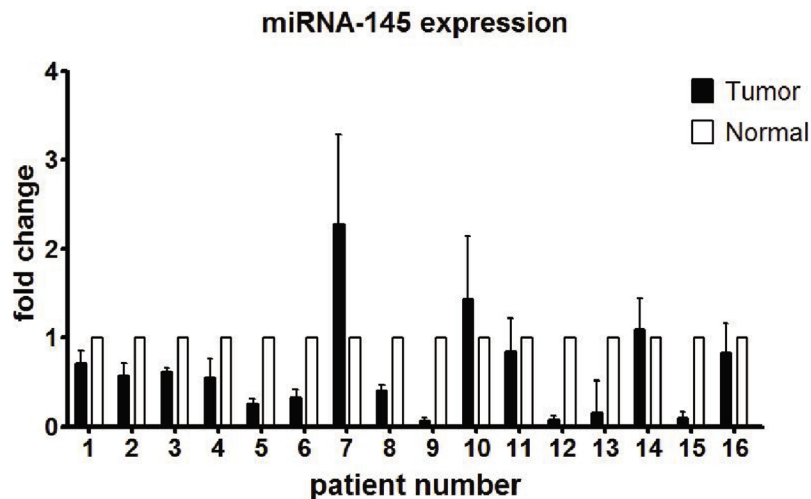


图1 肾癌组织与正常肾组织中 miRNA-145 的表达

Fig.1 The relative expression of miRNA-145 in renal cell carcinoma and normal renal tissue

2.2 miRNA-145 的表达与肾癌患者病理特征及临床分级之间的相关性

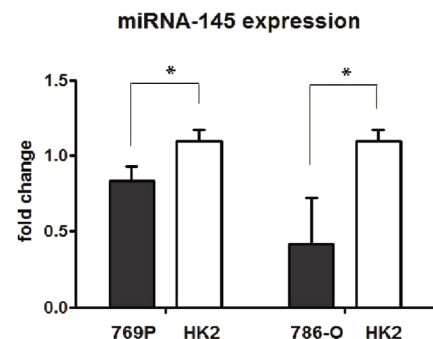
如表 1 所示,肾癌组织中 miRNA-145 的表达水平与肾癌的直径、病理核分级及临床分级均呈显著负相关($P<0.05$)。

2.3 miRNA-145 在肾癌细胞株中的表达

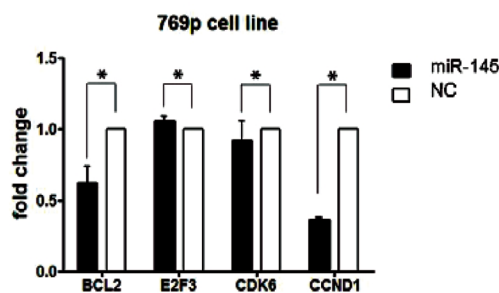
如图 2 所示,769P、786-O 肾癌细胞株中 miRNA-145 的表达量显著低于正常 HK-2 肾细胞($P<0.05$)。

2.4 miRNA-145 过表达对癌基因表达的影响

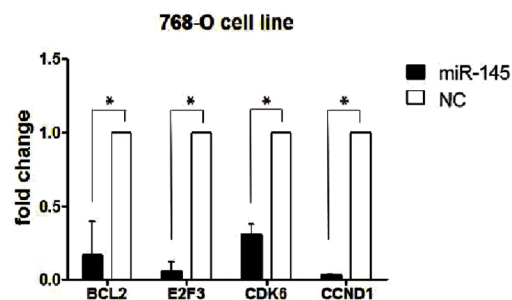
如图 3 所示,在转染 miRNA-145 mimics 的 769P、786-O 细胞中,其多个癌基因如 bcl2、e2f3、cdk6、ccnd1 的表达均较转染阴性对照 miRNA 显著降低($P<0.05$)。

图2 肾癌细胞株和正常肾细胞中 miRNA-145 的表达 (* $P<0.05$)Fig.2 The relative expression of miRNA-145 in renal cell carcinoma cell and normal renal cells(* $P<0.05$)

A:



B:

图3 转染 miRNA-145 后癌基因的 mRNA 的表达(* $P<0.05$)(A: 769P 细胞株各基因的表达情况;B: 786-O 细胞株各基因的表达情况)Fig.3 The expression levels of oncogenes after transfection of miRNA-145 mimics(* $P<0.05$) (A: the mRNA expression of multiple oncogenes in 769P; B: the mRNA expression of multiple oncogenes in 786-O)

3 讨论

miRNA-145 位于人类染色体 5q32-33,在多种肿瘤中呈低表达。研究发现 miRNA-145 的低表达与直肠癌的直径以及部位以及食管癌的分期均有关^[17,18]。而本研究结果显示 miRNA-145 在肾癌组织和细胞中均呈低表达,且与肾癌的直径、病理核分级及临床分级均呈显著负相关,表明 miRNA-145 的低表达可能在肾癌发生发展过程中也起重要作用。

尽管已有研究报道 miRNA-145 具有肿瘤抑制作用,但其在肿瘤细胞增殖、转移以及侵袭中的机制尚不完全清楚。研究发现,miRNA-145 在膀胱癌中呈低表达,通过靶向作用 FSCN1 抑制肿瘤细胞增殖^[9];在前列腺癌中,miRNA-145 通过相同的靶点抑制肿瘤细胞增殖、侵袭和转移^[14];在非小细胞肺癌中,miRNA-145 通过靶向作用于 c-Myc 抑制肿瘤细胞增殖^[15]。miRNA-145 在肾癌中通过启动子甲基化呈低表达状态,在肾癌细胞中高表达 miRNA-145 显著抑制肿瘤细胞增殖、侵袭能

力、并增加顺铂诱导的细胞凋亡,其作用机制可能是通过靶向结合至 ADAM17、c-Myc 等下游基因,抑制其表达^[12,16,19]。

凋亡逃逸参与了肿瘤发生发展、耐药等多个病理过程。Bcl-2 蛋白能稳定线粒体膜,抑制细胞色素 c 释放,阻止 Apaf1 和 caspase 蛋白激活,从而抑制凋亡,在细胞凋亡信号通路中发挥重要作用^[20]。E2f3、cdk6 和 ccnd1 都是重要的细胞周期调控因子^[21,22],与肿瘤的增殖、转移和侵袭密切相关。一个 miRNA 有多个下游靶点,而不同的 miRNA 可能作用于同一个靶点。Lee 等^[23]报道了 miRNA-145 的高表达会诱导下调肿瘤转移相关的基因,包括 ADAM22、SPOCK3、PLAUR、SLC7A5 和 FSCN1。因此,进一步研究 miRNA-145 的下游靶点意义重大。本研究通过转染 miRNA-145mimics 增加肾癌细胞中 miRNA-145 的表达后检测到癌基因 bcl2、e2f3、cdk6 和 ccnd1 基因的 mRNA 表达均有不同程度的抑制,表明 miRNA-145 可通过调控多个细胞凋亡相关的基因及细胞周期调节基因的表达起到抑癌作用,而 miRNA-145 的作用靶点是 bcl2、e2f3、cdk6 和 ccnd1 其中的一个还是多个,还需进一步研究。

随着肾癌发生发展分子机制研究的不断进展,其基因治疗已成为当前临床研究的热点。运用纳米粒子作为载体,将 miRNA-145 mimics/pre-miRNAs 输入肿瘤细胞可能成为肾癌基因治疗的一条新的线索,但需进一步深入研究。

参考文献(References)

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(1): 10-29
- [2] Protzel C, Maruschke M, Hakenberg OW. Epidemiology, Aetiology, and Pathogenesis of Renal Cell Carcinoma [J]. European Urology Supplements, 2012, 11(3): 52-59
- [3] Mickisch GH. Chemoresistance of renal cell carcinoma[J]. World J Urol, 1994, 12(4): 214-223
- [4] Rini BI, Atkins MB. Resistance to targeted therapy in renal-cell carcinoma[J]. Lancet Oncol, 2009, 10(10): 992-1000
- [5] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297
- [6] Sachdeva M, Mo YY. miR-145-mediated suppression of cell growth, invasion and metastasis[J]. Am J Transl Res, 2010, 2(2): 170-180
- [7] Zaman MS, Chen Y, Deng G, et al. The functional significance of microRNA-145 in prostate cancer [J]. Br J Cancer, 2010, 103 (2): 256-264
- [8] Chiyomaru T, Enokida H, Tatarano S, et al. miR-145 and miR-133a function as tumour suppressors and directly regulate FSCN1 expression in bladder cancer[J]. Br J Cancer, 2010, 102(5): 883-891
- [9] Arndt GM, Dossey L, Cullen LM, et al. Characterization of global microRNA expression reveals oncogenic potential of miR-145 in metastatic colorectal cancer[J]. BMC Cancer, 2009, 9: 374
- [10] Iorio MV, Visone R, Di Leva G, et al. MicroRNA signatures in human ovarian cancer[J]. Cancer Res, 2007, 67(18): 8699-8707
- [11] Kano M, Seki N, Kikkawa N, et al. miR-145, miR-133a and miR-133b: Tumor-suppressive miRNAs target FSCN1 in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Int J Cancer, 2010, 127(12): 2804-2814
- [12] Doberstein K, Steinmeyer N, Hartmetz AK, et al. MicroRNA-145 targets the metalloprotease ADAM17 and is suppressed in renal cell carcinoma patients[J]. Neoplasia, 2013, 15(2): 218-230
- [13] Slaby O, Redova M, Poprach A, et al. Identification of MicroRNAs associated with early relapse after nephrectomy in renal cell carcinoma patients [J]. Genes Chromosomes Cancer, 2012, 51 (7): 707-716
- [14] Fuse M, Nohata N, Kojima S, et al. Restoration of miR-145 expression suppresses cell proliferation, migration and invasion in prostate cancer by targeting FSCN1 [J]. Int J Oncol, 2011, 38 (4): 1093-1101
- [15] Chen Z, Zeng H, Guo Y, et al. miRNA-145 inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation by targeting c-Myc [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2010, 29: 151
- [16] Gan B, Lim C, Chu G, et al. FoxOs enforce a progression checkpoint to constrain mTORC1-activated renal tumorigenesis [J]. Cancer Cell, 2010, 18(5): 472-484
- [17] Slaby O, Svoboda M, Fabian P, et al. Altered expression of mir-21, mir-31, mir-143 and mir-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer[J]. Oncology, 2007, 72(5-6): 397-402
- [18] Wu BL, Xu LY, Du ZP, et al. miRNA profile in esophageal squamous cell carcinoma Downregulation of mir-143 and mir-145 [J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(1): 79-88
- [19] Doberstein K, Steinmeyer N, Hartmetz AK, et al. MicroRNA-145 targets the metalloprotease ADAM17 and is suppressed in renal cell carcinoma patients[J]. Neoplasia, 2013, 15(2): 218-230
- [20] Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(9): 647-656
- [21] Leone GJ, DeGregori z, Yan, et al. E2F3 activity is regulated during the cell cycle and is required for the induction of S phase [J]. Genes Dev, 1998, 12(14): 2120-2130
- [22] Fu MF, Wang CG, Li ZP, et al. Cyclind1: normal and abnormal functions[J]. Endocrinology, 2004, 145 (12): 5439-5447
- [23] Lee SJ, Kim SJ, Seo HH, et al. Over-expression of mir-145 enhances the effectiveness of HSVTK gene therapy for malignant glioma [J]. Cancer Letters, 2012, 320(1): 72-80