

miR-21 与肾癌转移的相关性及其对肾癌细胞侵袭能力的影响*

张辉^① 郭艳^② 尚超^③ 宋永胜^①

摘要 目的:探讨 miR-21 与肾癌转移的相关性,及 miR-21 对肾癌 Caki-1 细胞侵袭能力的影响。**方法:**实时 PCR 检测原发性肾癌和原发性转移肾癌组织中 miR-21 的表达。将 miR-21 的前体 pre-miR-21 和抑制物 anti-miR-21 分别转染肾癌 Caki-1 细胞,实时 PCR 验证转染效果,然后检测转染后细胞的侵袭能力。**结果:**与原发性肾癌相比,原发性转移肾癌组织中 miR-21 的表达显著上调;pre-miR-21 和 anti-miR-21 转染后能够显著升高和降低 Caki-1 细胞 miR-21 的表达量;pre-miR-21 组穿透滤膜的细胞数明显增加,而 anti-miR-21 组穿透滤膜的细胞数明显减少。**结论:**miR-21 与肾癌的侵袭转移相关,miR-21 能够促进肾癌细胞侵袭,在肾癌中具有促进转移的作用。

关键词 肾癌 转移 microRNA miR-21

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2013.12.005

Relationship between miR-21 and renal cancer metastasis and influence of miR-21 on the invasion ability of renal cancer cell

Hui ZHANG¹, Yan GUO², Chao SHANG³, Yongsheng SONG¹

Correspondence to: Yongsheng SONG; E-mail: sysqian@yahoo.com.cn

¹Department of Urinary Surgery, The Affiliated Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China

²Department of Central Laboratory, School of Stomatology

³Department of Neurobiology, China Medical University, Shenyang 110001, China

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 30901480 and 81172408), and the Science and Technology Research Project of the Education Department of Liaoning Province (No. L2011130)

Abstract Objective: The present study aims to investigate the relationship between miR-21 and renal cancer metastasis as well as the influence of miR-21 on the invasiveness ability of renal cancer Caki-1 cells. **Methods:** Real-time PCR was performed to detect miR-21 in primary renal cancer without and with metastasis. Pre-miR-21 and anti-miR-21 were transfected to Caki-1 cells, respectively, and real-time PCR was used to detect transfection effects. Finally, invasiveness changes in Caki-1 cells were detected after transfection. **Results:** miR-21 expression in primary renal cancer with metastasis was much higher than that in primary renal cancer without metastasis. After transfection, pre-miR-21 and anti-miR-21 significantly increased and decreased the miR-21 expression in Caki-1 cells, respectively. The transmembrane cells of the pre-miR-21 group increased significantly, whereas those of the anti-miR-21 group decreased significantly. **Conclusion:** miR-21 and renal cancer metastasis are related. miR-21 advances renal cancer cell invasion and metastasis.

Keywords: renal cancer, metastasis, microRNA, miR-21

肾癌是泌尿系统中最常见的恶性肿瘤之一,仅次于膀胱肿瘤,约占肾脏恶性肿瘤的85%。既往肾癌就诊时20%~35%已有转移,6%~15%是因为转移症状而就诊^[1],因此加强对肾癌转移的分子机制的研究尤为重要。microRNAs(miRNAs)是近年来发现的一类长度为19~25个核苷酸的非编码小分子RNA,主要通过与其靶基因mRNA 3'非翻译区(3'untranslation region, 3'UTR)的完全或不完全配对,引起mRNA降解或翻译抑制,从而在转录后水平调控基因的表达^[2]。miRNAs能够通过调节下游基因的表达和功能从而参与调控个体发育、细胞凋亡、增殖及分化等生命活

动^[3-4]。本研究拟应用实时PCR检测miR-21基因在肾癌中的表达,探讨miR-21与肾癌转移的相关性,及其表达改变对肾癌Caki-1细胞侵袭能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

所有组织标本均来源于2007年5月~2011年7月中国医科大学附属盛京医院泌尿外科收治的96例患者,包括65例原发性肾癌和31例原发性转移肾癌。患者年龄47~63岁,行经腹腔根治性肾切除术,经病理诊断证实为肾透明细胞癌,均未接受放疗和化疗,未转移肾癌均为肿瘤局限于肾脏的T_{2a}期肾

作者单位:①中国医科大学附属盛京医院泌尿外科(沈阳市110001);②中国医科大学附属口腔医院泌尿外科;③基础医学院神经生物教研室

*本文课题受国家自然科学基金资助项目(编号:30901480, 81172408)和辽宁省教育厅科学技术研究项目(编号:L2011130)资助

通信作者:宋永胜 sysqian@yahoo.com.cn

癌患者,转移性肾癌均为T_{3b}期与T_{3c}期肾癌患者,肿瘤均侵及下腔静脉。组织标本切除后浸入RNAlater溶液中,放入-80℃冰箱中保存。人肾癌细胞系Caki-1购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。miRNA分离试剂盒及miRNA检测试剂盒All-in-One™ miRNA qRT-PCR Detection Kit购自Genecopoeia公司,pre-miR-21、anti-miR-21及control miRNA购自Ambion公司,转染试剂Transmessenger购自Qiagen公司,Transwell小室购自Coster公司,人工基质Matrigel购自BD公司,引物由北京三博远志公司合成。

1.2 方法

1.2.1 miR-21的表达检测

应用Ambion公司的mirVana™ miRNA isolation试剂盒分离组织中的总microRNA,具体按照使用说明书操作。应用Ambion公司的All-in-One™ miRNA qRT-PCR Detection Kit对获取的microRNA的3'进行加“Poly A”处理,然后将Poly A化的RNA进行反转录反应,具体按照使用说明书操作。以U6为内参基因,按照试剂盒说明书扩增miR-21基因。miR-21引物,上游:5'-GTGCAGGTCCGAGGT-3';下游:5'-GCCGCTAGCTTATCAGACTGATGT-3';U6引,上游:5'-CTCGCTTCGGCAGCA CA-3';下游:5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。应用ABI公司的7500 Real-time PCR仪,7500 Software v2.0软件。实验获得数据采用比较CT值法(2^{-ΔΔCT}法)进行相对定量分析。计算公式:1)改变的倍数=2^{-ΔΔCT}; 2)ΔΔCT=ΔCT_{肿瘤组}-ΔCT_{癌旁组}; 3)ΔCT=CT_{靶基因}-CT_{内参}。结果为相对于对照组实验组中靶基因的表达相对于内参的改变倍数。

1.2.2 细胞转染

收获处于对数生长期的Caki-1细胞,以5×10⁴个细胞/孔接种于6孔培养板中,37℃,5%CO₂环境中培养24h,细胞长至80%融合。按说明书操作,microRNA(每孔1 μg,6孔板)通过Enhancer R试剂浓缩并与4 μL TransMessenger形成复合物。转染复合物稀释到900 μL无抗生素培养基中培养中,与细胞混合;2h后PBS洗1次,然后用正常培养基培养。在转染后24h进行体外细胞侵袭实验。

1.2.3 实验分组

以未转染的Caki-1细胞为空白对照组(C1);以转染control miRNA的Caki-1细胞为阴性对照组(m-C2);以转染pre-miR-21的Caki-1细胞为pre-miR-21组(pre-miR-21);以转染anti-miR-21的Caki-1细胞为anti-miR-21组(anti-miR-21)。

1.2.4 体外细胞侵袭实验

将待检测细胞加入含人工基质Matrigel的Transwell小室中,每组设3个复孔。培养12h后取出滤膜固定、染色。随机于显微镜下取上、下、左、右、中心5个视野,计数穿膜细胞

数,取每个视野的平均数表示肿瘤细胞的侵袭能力。

1.3 统计学分析

每组实验重复3次,计量资料结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用SPSS13.0软件对组间差异进行单因素方差分析和t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实时PCR检测肾癌组织中miR-21的表达

通过引物溶解曲线分析,miR-21基因扩增成功。Real-time PCR结果显示,miR-21在原发未转移肾癌组织和原发伴转移肾癌组织中的ΔCT分别为6.318±0.487与5.451±0.457,ΔΔCt为-0.843,原发伴转移肾癌组织中miR-21较原发未转移肾癌组织明显上调,为原发未转移肾癌组织中miR-21表达量的179.4%;而原发未转移肾癌组织和原发伴转移肾癌组织中miR-21的表达,分别为癌旁正常组织中miR-21的表达的155.3%和278.6%(图1),差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。通过Pearson相关分析,miR-21表达和肾癌侵袭的相关系数为0.624,结果表明在miR-21的表达与肾癌的转移明显正相关。

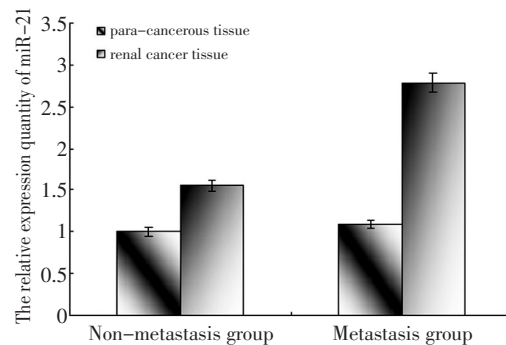


图1 荧光定量PCR法检测肾癌组织和相应癌旁正常组织中miR-21基因的表达(n=3)

Figure 1 miR-21 expression in renal cancer and paracancerous tissue, which was detected by using real-time PCR (n=3)

2.2 实时PCR检测转染后Caki-1细胞中miR-21的表达

Real-time PCR结果显示,空白对照组、阴性对照组、pre-miR-21组和anti-miR-21组的ΔCT分别为5.714±0.487、5.637±0.457、4.529±0.487和6.806±0.457。与对照组相比,pre-miR-21组中miR-21的表达量显著增加,为对照组表达量的227.3%,而anti-miR-21组中miR-21的表达量显著降低,为对照组表达量的46.9%,差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。

2.3 体外细胞侵袭实验

空白对照组、阴性对照组、pre-miR-21组和anti-miR-21组都有细胞穿透滤膜,细胞数分别为18.3±2.7、19.4±2.2、31.7±3.1和11.61±1.8(图2,3),空白和阴性对照组穿透滤膜的细胞数没有明显差异($P > 0.05$),pre-miR-21组穿透滤膜的细胞数明显增

加,而 anti-miR-21 组穿透滤膜的细胞数明显减少,差异有统计学意义($P<0.05$)。

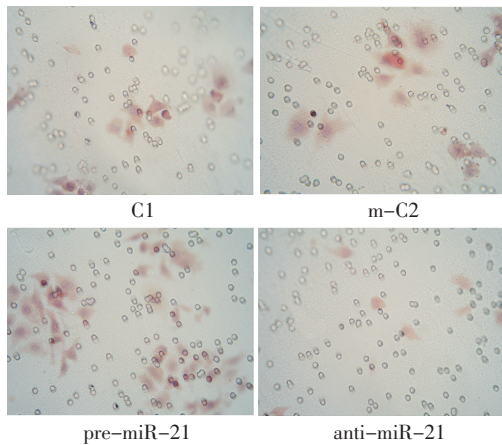


图2 体外细胞侵袭实验检测转染后Caki-1细胞侵袭能力的变化($\times 400$)
Figure 2 Change in the invasion ability of Caki-1 cells obtained through *in vitro* cell invasion experiment after transfection ($\times 400$)

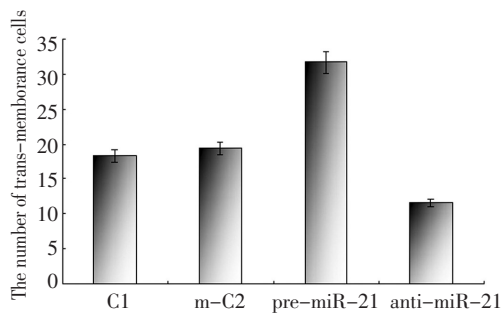


图3 体外侵袭实验检测转染后Caki-1细胞的穿膜细胞数
Figure 3 Transmembrane cell number of Caki-1 cells obtained through *in vitro* cell invasion experiment after transfection

3 讨论

miRNA是近年来发现的一类长度仅为18~25个核苷酸的内源性非编码小RNA,成熟miRNA的5'非翻译区的2~7个核苷酸的“种子序列”可以与靶mRNA的3'-非翻译区互补结合,在转录后水平上抑制靶基因的表达。1993年,首个microRNA lin-4被发现,从此揭开了对microRNA研究的序幕^[5]。miRNA在肿瘤中发挥着相当于癌基因或抑癌基因的作用,调节着肿瘤细胞的多种重要生物学行为。近年来,miRNAs已经迅速发展为肿瘤等疾病潜在的重要分子标志物^[6-8]。

miR-21定位于17q23.1,具有癌基因特性的miR-21在胰腺癌、食管癌、肺癌及结肠癌等恶性肿瘤中高表达^[9-13],并通过抑制凋亡而与肿瘤的发生及进展有关^[14]。miR-21在胰腺癌组织中的表达显著高于正常胰腺,其高表达与胰腺癌不良预后有关^[15]。

为了明确miR-21与肾癌转移的相关性,本研究应用荧光定量PCR法检测发现,miR-21在原发伴转

移肾癌组织中的表达较原发未转移肾癌明显上调。说明miR-21与肾癌的转移具有相关性,miR-21因可能作为一个肿瘤转移促进基因在肾癌的转移中发挥一定的作用。本研究将miR-21的前体pre-miR-21和抑制物anti-miR-21分别转染了肾癌Caki-1细胞,然后检测了转染后细胞的侵袭能力,结果发现与对照组相比,pre-miR-21组穿透滤膜的细胞数明显增加,而anti-miR-21组穿透滤膜的细胞数明显减少。进一步证实了miR-21能够促进肾癌细胞侵袭,在肾癌中发挥转移促进基因的作用,抑制其表达能够显著抑制肾癌细胞侵袭。

参考文献

- 葛宏发,李慎勤.泌尿外科疾病诊断和鉴别诊断[M].2版.北京:人民卫生出版社.2001:199.
- Silahtaroglu A, Stenvang J. MicroRNAs, epigenetics and disease[J]. Essays Biochem, 2010, 48(1): 165-185.
- Ross SA, Davis CD. MicroRNA, Nutrition, and Cancer Prevention [J]. Adv Nutr, 2011, 2(6): 472-485.
- Nimmo RA, Slack FJ. An elegant miRror: microRNAs in stem cells, developmental timing and cancer[J]. Chromosoma, 2009, 118(4): 405-418.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14[J]. Cell, 1993, 75(5): 843-854.
- Fanini F, Vannini I, Amadori D, et al. Clinical implications of microRNAs in lung cancer[J]. Semin Oncol, 2011, 38(6): 776-780.
- Di Leva G, Croce CM. miRNA profiling of cancer[J]. Curr Opin Genet Dev, 2013, 23(1): 3-11.
- Hogan NM, Joyce MR, Kerin MJ. MicroRNA expression in colorectal cancer[J]. Cancer Biomark, 2012, 11(6): 239-243.
- 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: 1901-1908.
- Vösa U, Voorder T, Kolde R, et al. Meta-analysis of microRNA expression in lung cancer[J]. Int J Cancer, 2013, 132(12):2884-2893.
- Sicard F, Gayral M, Lulka H, et al. Targeting miR-21 for the Therapy of Pancreatic Cancer[J]. Mol Ther, 2013, 21(5):986-994.
- Baer C, Claus R, Plass C. Genome-wide epigenetic regulation of miRNAs in cancer[J]. Cancer Res, 2013, 73(2):473-477.
- Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, et al. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma[J]. JAMA, 2008, 299: 425-436.
- Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells[J]. Cancer Res, 2005, 65: 6029-6033.
- Dillhoff M, Liu J, Frankel W, et al. MicroRNA-21 is overexpressed in pancreatic cancer and a potential predictor of survival[J]. J Gastrointest Surg, 2008, 12: 2171-2176.

(2013-04-03 收稿)

(2013-05-08 修回)

(本文编辑:杨红欣)