

微小 RNA204 在人肾透明细胞癌中的表达及临床意义

张林超,赵俊峰,孙继建

(河南省中医院泌尿外科,郑州 450002)

[摘要] **目的** 研究微小 RNA204(miR-204)在人肾透明细胞癌(RCCC)中的表达及临床意义。**方法** 收集泌尿外科行手术切除的 RCCC 及对应癌旁正常肾脏组织标本共 65 例,运用 qRT-PCR 技术检测 miR-204 在 RCCC 及癌旁组织中的表达水平,统计分析 miR-204 表达水平与患者临床病理资料间的相关性;采用人工合成的 miR-204 模拟物转染人 RCCCaki-1 细胞,分别采用 qRT-PCR 及 Western-Blot 检测转染后 miR-204 下游潜在靶点 Bcl-2 及 SIRT1 mRNA 及蛋白的表达变化。**结果** miR-204 在 RCCC 组织中表达水平显著低于对应癌旁正常肾组织($P < 0.05$);miR-204 低表达与肿瘤体积增大(> 3 cm, $P < 0.05$)、肿瘤淋巴结转移($P < 0.05$)及高 TNM 分期(Ⅲ+Ⅳ期, $P < 0.05$)显著相关;miR-204 转染人 RCCCaki-1 细胞后可显著降低细胞内 Bcl-2 及 SIRT1 mRNA 及蛋白的表达水平($P < 0.05$)。**结论** miR-204 在 RCCC 组织中表达下调并与肿瘤恶性临床病理特征有关,miR-204 可能通过下调 Bcl-2 及 SIRT1 的表达来抑制 RCCC 的发生、发展过程。

[关键词] 微小 RNA204;肾透明细胞癌;基因,Bcl-2

[中图分类号] R737.11

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)15-2034-03

Expression and clinical significance of microRNA-204 in human renal clear cell carcinoma

Zhang Linchao, Zhao Junfeng, Sun Jijian

(Department of Urology, Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan 450002, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression and clinical significance of microRNA-204(miR-204) in human renal clear cell carcinoma(RCCC). **Methods** 65 cases of resected RCCC tissue and corresponding normal tumor-adjacent tissue were collected and detected the expression level of miR-204 by using qRT-PCR. The correlation between the miR-204 expression level and clinical pathological features was statistically analyzed. The artificial miR-204 mimics were adopted to transfect into Caki-1 cells, then the Western blot was used to detect the expression of Bcl-2 as the downstream potential targets of miR-204 and SIRT1 mRNA and protein. **Results** The expression level of miR-204 in the RCCC tissue was significantly lower than that in the normal tumor-adjacent tissues ($P < 0.05$); the low expression of miR-204 was significantly associated with the tumor size (> 3 cm, $P < 0.05$), lymph node metastasis ($P < 0.05$) and advanced TNM stage (Ⅲ + Ⅳ, $P < 0.05$). Both the mRNA and protein expression in RCCC Caki-1 cells were down-regulated after transfection. **Conclusion** The expression of miR-204 is down-regulated in the RCCC tissue and is related to the malignant clinicopathological features, and miR-204 may suppress the RCCC genesis and development through down-regulating the expression of Bcl-2 and SIRT1.

[Key words] mircoRNA-204; renal clear cell carcinoma; genes, Bcl-2

肾透明细胞癌(renal clear cell carcinoma, RCCC)是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一,起源于肾小管上皮组织,约占全部恶性肿瘤的 3% 左右^[1]。RCCC 早期无明显症状,多数患者发现时已因发生远处转移而失去了进行根治手术的机会^[2]。随着肿瘤分子生物学研究的进展,癌基因与抑癌基因的相互作用在肾癌发生、发展中的作用日益突出,但其具体分子机制仍有待进一步研究。

微小 RNA(microRNAs, miRNA)是一类长约 18~25 nt 的非编码小 RNA,它能够与靶基因的 mRNA 特异性结合进而抑制 mRNA 的翻译过程或降解 mRNA 单链^[3]。miR-204 已经被证实是一种重要的肿瘤调节基因,在多种人类恶性肿瘤中存在表达下调甚至缺失,并与肿瘤增殖、凋亡等多种生物学行为密切相关^[4-8]。但是,miR-204 在人 RCCC 中的临床病理意义及其具体分子机制尚不清楚。本研究通过检测 miR-204 在 RCCC、对应癌旁组织中的表达情况及其对下游潜在靶点 Bcl-2、SIRT1 的调控作用,研究 miR-204 在 RCCC 发生、发展中的临床意义作用机制,为 RCCC 的诊断与治疗提供新的分子

靶点。

1 材料与方

1.1 临床标本 本课题经本院医学伦理委员会批准审核后开展。收集 2012 年 1 月至 2014 年 3 月于本院泌尿外科行手术切除的 RCCC(观察组)及对应癌旁组织(距手术切缘大于 2 cm,对照组)标本 65 例,其中男 35 例,女 30 例,年龄 31~70 岁,平均(47.2±2.1)岁,其中 29 例患者存在淋巴结转移,Fuhrman 分级 I~II 级者 44 例,III~IV 级者 21 例,TNM 分期 I~II 期者 37 例,III~IV 期者 28 例。所有入组患者术前均未接受放、化疗。标本于离体 30 min 内取材,分别置于液氮或 4% 多聚甲醛溶液中保存。

1.2 仪器与试剂 Trizol 试剂及脂质体 2000(lipofectamine™ 2000)购自美国 Invitrogen 公司;逆转录试剂盒购自美国 Fermentas 公司;real time PCR 试剂盒购自宝生生物工程(大连)有限公司;miR-204 特异性逆转录引物、RNU6B 引物及人工合成的 miR-204 模拟物均购自广州锐博生物科技有限公司;Bcl-2 引物(5'-CCT TTT TGT AAC TGT ACG GCC-3';5'-CTT

TGG CAG TAA ATA GCT GAT TCG AC-3'), SIRT1 引物(5'-CAA AGG AGC AGA TTA GTA GGC G-3'; 5'-CTC TGG CAT GTC CCA CTA T CA C-3'), β -actin 引物(5'-CTC CAT CCT GGC CTC GCT GT-3'; 5'-GCT GTC ACC TTC ACC GTT CC-3')由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成;兔抗人 Bcl-2 多克隆抗体(# 2876)、兔抗人 SIRT1 多克隆抗体(# 2496)购自美国 CST 公司,鼠抗人 β -actin 单克隆抗体(sc-47778)购自美国 Santa Cruz 公司,BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自江苏碧云天生物技术研究所,ECL 化学发光试剂盒购自美国 Milipore 公司。

1.3 方法

1.3.1 qRT-PCR 按 RNA 提取试剂说明书方法提取 RCCC 及癌旁组织中的 miRNA 及 mRNA,按以下条件进行 RNA 逆转录反应:预变性 70 °C 5 min,逆转录 37 °C 1 h,酶灭活 85 °C 5 min。以 2 μ L cDNA 配制 Real-time PCR 体系,按如下条件进行 PCR 反应:预变性 95 °C 30 s,变性 95 °C 5 s,退火延伸 60 °C 30 s,扩增 40 个循环。以 RNU6B 基因或 β -actin 基因为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR-204 相对表达量。每个样本独立重复实验 3 次。

1.3.2 细胞培养 人 RCCC Caki-1 细胞株培养于含 10%FBS 的 1 \times DMEM 培养基中,置于 37 °C、5%CO₂、饱和湿度下进行培养。每 2~4 日传代 1 次,稳定传代 2~3 代后,取对数生长期细胞进行实验。

1.3.3 细胞转染 Caki-1 细胞接种于 6 孔板中,用含 10% FBS 的 1 \times DMEM 培养基培养细胞至融合度达 50%左右,实验分组及处理如下:实验组每孔加入 100 pmol miR-204 模拟物及 5 μ L 转染试剂;对照组每孔加入 100 pmol 阴性对照(negative control,NC)模拟物及 5 μ L 转染试剂。每孔加入不含血清的 1 \times DMEM 培养基调整终体积至 2 mL,置于 37 °C、5%CO₂、饱和湿度下培养 6 h 后,更换完全培养基继续培养。独立重复实验 3 次。

1.3.4 Western blot 取转染 72 h 后的 Caki-1 细胞,加入 RIPA 细胞裂解液置冰上裂解 10 min,裂解液收集于 1.5 mL EP 管中,4 °C、14 000 r/min 离心 10 min 后取上清液。BCA 法测定总蛋白浓度,每孔加入 50 μ g 蛋白样品,10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白。采用 BIO-RAD 半干转印系统,20V 转膜 1 h,5% BSA 室温封闭 1.5 h 后加入 1:1 000 稀释的 Bcl-2 一抗、SIRT1 一抗及 β -actin 一抗,4 °C 摇晃孵育过夜,0.01 M TBST 漂洗 5 min \times 3 次后加入 1:5 000 稀释的羊抗兔二抗,37 °C 孵育 1 h。0.01 M TBST 漂洗 5 min \times 3 次。于暗室内,在膜上滴加 ECL 溶液,并使胶片曝光,全自动洗片机洗片。每样本独立重复实验 3 次。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RCCC 组织及对应癌旁组织中 miR-204 的相对表达量比较 经 qRT-PCR 技术检测,65 例 RCCC 组织中 miR-204 的相对表达量显著低于癌旁正常肾脏组织(2.344 \pm 0.193 vs. 8.617 \pm 0.482),差异有统计学意义(*P*<0.05)。

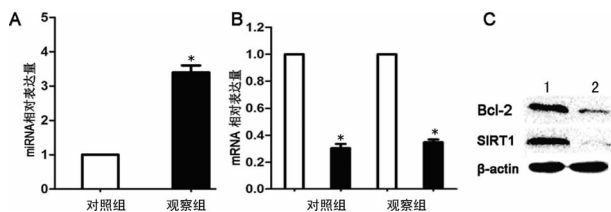
2.2 miR-204 表达水平与 RCCC 患者临床病理特征间的相关性 为研究 miR-204 表达水平与肿瘤临床特征间的相关性,将 65 例肿瘤标本按表 1 所列项目分组,经 student-*t* 检验,RCC

组织中 miR-204 低表达与肿瘤淋巴结转移、肿瘤体积增大(>3 cm)和高 TNM 分期(III+IV)间具有显著相关性(*P*<0.05)。

表 1 miR-204 表达与 RCCC 患者临床病理特征的关系($\bar{x}\pm s, n=65$)

项目	miR-204 平均表达量	<i>t</i>	<i>P</i>
性别		0.791	0.498
男	5.379 \pm 0.201		
女	5.481 \pm 0.192		
年龄(岁)		0.905	0.314
≤ 50	5.503 \pm 0.191		
> 50	5.491 \pm 0.207		
淋巴结转移		3.017	0.003
无	8.083 \pm 0.111		
有	3.105 \pm 0.097		
肿瘤体积(cm)		2.593	0.011
≤ 3	7.743 \pm 0.202		
> 3	3.711 \pm 0.173		
Fuhrman 分级		1.687	0.062
I + II	6.091 \pm 0.241		
III + IV	5.937 \pm 0.182		
TNM 分期		3.341	0.001
I + II	8.313 \pm 0.132		
III + IV	3.089 \pm 0.107		

2.3 过表达 miR-204 对 RCCC Caki-1 细胞中 Bcl-2 及 SIRT1 表达的影响 向 Caki-1 细胞内转染 miR-204 模拟物后可显著升高细胞内 miR-204 的表达水平(图 1A, *P*<0.05)。qRT-PCR 及 Western blot 检测发现,与对照组相比,过表达 miR-204 显著下调了 Caki-1 细胞内 Bcl-2 及 SIRT-1 mRNA(图 1B)和蛋白(图 1C)的表达水平(*P*<0.05)。



*: *P*<0.05,与对照组比较;1:对照组;2:观察组。

图 1 过表达 miR-204 下调 Caki-1 细胞中 Bcl-2 及 SIRT1 的表达

3 讨论

RCCC 是最常见的肾脏恶性肿瘤之一。由于早期症状隐匿,约 30% 的患者就诊时就因已发生远处转移而失去根治手术机会,而在可手术切除的 RCCC 患者中,也仍有 30% 的患者会发生早期局部复发^[9],这提示 RCCC 有着较高的复发、转移潜能,但其具体分子机制尚不完全清楚。

近年来研究发现,RCCC 组织中存在大量 miRNA 异常表达,并在 RCCC 的生物学进展中发挥重要作用。如 miR-210、miR-122、miR-34a、miR-21 在 RCCC 组织中表达显著升高,而 miR-135a、miR-1973 的表达水平则较正常肾脏组织明显下调^[10]。

Chen 等^[11]检测了 68 例 RCCC 组织中 miRNA 的表达情况,发现有 74 种 miRNA 存在异常表达,其中 miR-141 在 92.6% 的 RCCC 中呈现低表达状态并与患者不良预后有关,体外研究证实,过表达 miR-141 可显著抑制 RCCC 细胞的增殖、迁移及侵袭能力。本课题通过研究证实,miR-204 在 RCCC 组织中的表达水平显著低于对应癌旁组织,并且其低表达状态与肿瘤体积增大、肿瘤淋巴结转移及高 TNM 分期等恶性临床病理特征密切相关。提示 miR-204 在 RCCC 进展中具有重要的调控作用。

作为一种重要的抑癌分子,miR-204 可通过下调肿瘤中 MEIS1、FOXC1、Mcl-1 等多个癌基因的表达水平来发挥其抗肿瘤作用^[12-14]。为进一步研究 miR-204 对 RCCC 的抑癌分子调控机制,通过体外转染方法,在 RCCC 细胞 Caki-1 中成功过表达 miR-204,通过 qRT-PCR 及 Western blot 检测发现,过表达 miR-204 后,Caki-1 细胞内 Bcl-2 及 SIRT1 mRNA 及蛋白质的表达水平出现显著下调。在临床实践中,以铂类药物为基础的化疗方案在 RCCC 的化疗中具有重要作用,新近研究证实,miR-204 可通过下调 Bcl-2 的表达来增强胃癌及神经母细胞瘤对顺铂的化疗敏感性,本课题研究结果也表明 miR-204 可显著下调 RCCC 肿瘤细胞中 Bcl-2 的表达,结合 miR-204 在 RCCC 组织中的低表达状态,提示 miR-204 表达缺失可能是 RCCC 患者对铂类药物化疗耐药的重要机制之一。上皮细胞-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是肿瘤发生淋巴结及远处转移的重要分子机制之一,在胃癌中的研究表明^[15],miR-204 能够通过下调胃癌细胞内 SIRT1 蛋白的表达进而调控 E 钙黏蛋白、N 钙黏蛋白等多种 EMT 重要分子的表达水平,来实现最终抑制胃癌细胞的侵袭能力。本课题体外实验证实,过表达 miR-204 可显著下调 RCCC 细胞中 SIRT1 的表达水平,组织学研究表明,miR-204 低表达与 RCCC 肿瘤淋巴结转移及高 TNM 分期密切相关,结合既往研究结果可以推测 miR-204 可能通过下调 RCCC 细胞中 SIRT1 的表达、抑制肿瘤 EMT 来发挥其抗肿瘤侵袭、转移作用。

综上所述,miR-204 在 RCCC 组织表达显著下调,低表达 miR-204 与 RCCC 恶性临床病理特征密切相关。miR-204 可能通过下调 Bcl-2 及 SIRT1 的表达水平从而发挥其肿瘤抑制作用。因此,miR-204 在 RCCC 的诊断及生物分子治疗中可能具有一定的发展潜力。

参考文献

- [1] Buczek M, Escudier B, Bartnik E, et al. Resistance to tyrosine kinase inhibitors in clear cell renal cell carcinoma: from the patient's bed to molecular mechanisms[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1845(1):31-41.
- [2] Povoski SP, Hall NC, Murrey DA Jr, et al. Multimodal imaging and detection strategy with 124 I-labeled chimeric monoclonal antibody cG250 for accurate localization and confirmation of extent of disease during laparoscopic and open surgical resection of clear cell renal cell carcinoma[J]. *Surg Innov*, 2013, 20(1):59-69.
- [3] Dvinge H, Git A, Graef S, et al. The shaping and functional consequences of the microRNA landscape in breast cancer[J]. *Nature*, 2013, 497(7449):378-382.
- [4] Zhao JJ, Chen PJ, Duan RQ, et al. Up-regulation of miR-630 in clear cell renal cell carcinoma is associated with lower overall survival[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(6):3318-3323.
- [5] Li XC, Xin SY, He ZZ, et al. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor PDCD4 and promotes cell transformation, proliferation, and metastasis in renal cell carcinoma[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 33(6):1631-1642.
- [6] Ma L, Deng XB, Wu MH, et al. Down-regulation of miRNA-204 by LMP-1 enhances CDC42 activity and facilitates invasion of EBV-associated nasopharyngeal carcinoma cells[J]. *FEBS Lett*, 2014, 588(9):1562-1570.
- [7] Ryan J, Tivnan A, Fay J, et al. MicroRNA-204 increases sensitivity of neuroblastoma cells to cisplatin and is associated with a favourable clinical outcome[J]. *Br J Cancer*, 2012, 107(6):967-976.
- [8] Li W, Jin X, Zhang Q, et al. Decreased expression of miR-204 is associated with poor prognosis in patients with breast cancer[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(6):3287-3292.
- [9] Kroeger N, Xie W, Lee JL, et al. Metastatic non-clear cell renal cell carcinoma treated with targeted therapy agents: characterization of survival outcome and application of the International mRCC database consortium criteria [J]. *Cancer*, 2013, 19(16):2999-3006.
- [10] Munari E, Marchionni L, Chitre A, et al. Clear cell papillary renal cell carcinoma: micro-RNA expression profiling and comparison with clear cell renal cell carcinoma and papillary renal cell carcinoma[J]. *Hum Pathol*, 2014, 45(6):1130-1138.
- [11] Chen X, Wang X, Ruan A, et al. miR-141 is a key regulator of renal cell carcinoma proliferation and metastasis by controlling EphA2 expression[J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(10):2617-2630.
- [12] Garzon R, Garofalo M, Martelli MP, et al. Distinctive microRNA signature of acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic mutated nucleophosmin[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(10):3945-3950.
- [13] Conte I, Carrella S, Avellino R, et al. miR-204 is required for lens and retinal development via Meis2 targeting[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(35):15491-15496.
- [14] Huang J, Zhao L, Xing L, et al. MicroRNA-204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation[J]. *Stem Cells*, 2010, 28(2):357-364.
- [15] Zhang L, Wang X, Chen P. MiR-204 down regulates SIRT1 and reverts SIRT1-induced epithelial-mesenchymal transition, anoikis resistance and invasion in gastric cancer cells[J]. *BMC Cancer*, 2013, 13:290.