

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.06.005

微小 RNA-1180 转染对肾癌细胞生长的影响

王 勇¹, 郭永连¹, 陈 琳¹, 李国灏¹, 余家俊¹, 程 薇^{2△}

(1. 华中科技大学同济医学院附属武汉市中心医院泌尿外科, 武汉 430014;

2. 华中科技大学同济医学院附属梨园医院, 武汉 430077)

[摘要] **目的** 探讨微小 RNA-1180(miR-1180)转染对肾癌细胞系 786-O 和 ACHN 生长的影响。**方法** 肾癌细胞分为两组:dsControl 组和 miR-1180 组。实时定量(qRT)-PCR 检测 p21 mRNA 的表达变化。Western blot 检测 p21、细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)4、CDK6 和 CyclinD1 蛋白的表达变化。流式细胞术(FCM)检测细胞周期变化,使用多靶扫描法(MTS)和集落形成实验检测细胞活力和增殖能力。**结果** qRT-PCR 结果显示,与对照组相比,转染 miR-1180 后 786-O 和 ACHN 细胞中 p21 mRNA 水平分别上调 2.54 倍($P<0.01$)和 2.49 倍($P<0.01$)。p21 蛋白表达趋势与 qRT-PCR 结果相符,CDK4、CDK6 和 CyclinD1 蛋白的表达明显下调。FCM 结果显示,转染 miR-1180 后,位于 G₀/G₁ 期的细胞比例明显增大,而位于 S 期和 G₂/M 期的细胞比例明显下降,表明细胞周期被阻滞在 G₀/G₁ 期。MTS 结果显示,与 dsControl 组相比,转染 miR-1180 后,两种肾癌细胞活力明显降低。集落形成实验显示,miR-1180 组的集落数数量明显较少,表明细胞增殖能力降低。**结论** miR-1180 能显著激活肾癌细胞中 p21 蛋白的表达,并抑制肾癌细胞 786-O 和 ACHN 的生长。

[关键词] 微小 RNA-1180;p21;细胞周期蛋白依赖性激酶类;细胞周期蛋白质类;肾肿瘤

[中图分类号] R714.258

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)06-0736-04

Effect of microRNA-1180 transfection on growth of renal cell carcinoma

WANG Yong¹, GUO Yonglian¹, CHEN Lin¹, LI Guohao¹, YU Jiajun¹, CHENG Wei^{2△}

(1. Department of Urological Surgery, Affiliated Wuhan Municipal Central Hospital, Tongji Medical College,

Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430014, China; 2. Affiliated Liyuan

Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430077, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of microRNA-1180 transfection on the growth of renal cell carcinoma lines 786-O and ACHN. **Methods** The renal carcinoma cells were divided into the two groups: control group (transfecting dsControl) and experimental group (transfecting miR-1180). The expression change of p21 mRNA was detected by qRT-PCR. Western blot was conducted to analyze the expression changes of p21, CDK4, CDK6 and CyclinD1 proteins. Flow cytometry (FCM) was used to detect the cell cycle change. The MTS assay was conducted to detect the cell viability and the colony forming assay was performed to examine the cell proliferation ability. **Results** The qRT-PCR results showed that compared with the negative control dsControl group, after miR-1180 transfection, the expression level of p21 mRNA in 786-O and ACHN cells was up-regulated to 2.54-fold and 2.49-fold respectively ($P<0.01$). The expression trend of p21 protein was consistent with qRT-PCR results. The expression of CDK4, CDK6 and CyclinD1 proteins were significantly down-regulated. The FCM results showed that the proportion of cells in G₀/G₁ phase was significantly increased after transfection of miR-1180, but the proportion of cells in S phase and G₂/M phase was decreased significantly, indicating that the cell cycle was arrested in G₀/G₁ phase. The MTS assay results showed that compared with the dsControl group, the viability of the two kinds of renal carcinoma cells was significantly decreased. The colony formation assay showed that the number of colonies formed in the miR-1180 group was smaller, indicating the proliferation ability of miR-1180 transfected cells was decreased. **Conclusion** miR-1180 can significantly activate the p21 protein expression and inhibit the growth of renal carcinoma cell lines 786-O and ACHN.

[Key words] miR-1180;p21;cyclin-depedent kinases;cell cycle proteins kidney neoplasms

肾细胞癌简称肾癌,2015 年美国癌症协会的调查显示,肾癌新发病例 61 560 例,死亡病例 14 080 例^[1]。肾癌对化疗和放疗均不敏感,首选治疗方案依然是手术切除。然而仍有很多肾癌患者的预后并不理想^[2],寻找一种有效的靶基因治疗一直是肾癌研究的热点。肿瘤细胞周期调控的异常导致其增殖能力增强,与肿瘤的发生、发展密切相关。p21 是目前已知的具有最广泛细胞周期依赖性激酶抑制活性的蛋白,广泛参与细胞增殖、分化、衰老、凋亡等多种细胞功能的变化^[3]。研究表明肾癌

组织中 p21 蛋白的表达明显下调,且 p21 蛋白表达水平与患者的预后密切相关^[4]。微小 RNA(miR-1180)是新近发现的具有激活 p21 蛋白表达的小分子非编码 RNA^[5]。本研究旨在研究 miR-1180 能否激活肾癌细胞中 p21 基因的表达,并观察其对肾癌细胞生长的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料 胎牛血清、DMEM 和 RPMI1640 培养基购于美国 Gibco 公司;人肾癌细胞系 786-O 和 ACHN 购于中国科学院

生物化学与细胞生物学研究所; Lipofectamine 2000、Super-Script reverse transcriptase 和超敏增强化学发光法(ECL)试剂盒购于美国 Invitrogen 公司; dsControl^[6](一组已知的缺少人类基因重要同源性的 dsRNA, 反义链: 5'-UCU ACU GUC ACU CAG UAG U-3') 和 miR-1180 mimics (5'-GGA CCC ACC CGG CCG GGA AUA-3') 购于广州锐博生物科技有限公司, miR-1180 与 p21 基因启动子序列特异性结合(图 1); StepOne PlusTM Real-Time PCR System 购于美国 ABI 公司; 荧光定量 PCR 试剂盒购于日本 TaKaRa 公司; PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成; 一抗 β -actin、p21、CDK4、CDK6 和 CyclinD1 购于美国 Cell Signaling Technology 公司; 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔/鼠二抗购于美国 Affinity 公司。BCA protein assay kit 购于美国 Pierce 公司; MTS 试剂盒购于美国 Sigma 公司。

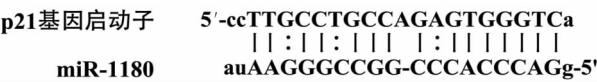


图 1 miR-1180 序列及其特异性结合的人 p21 基因启动子转录起始点上游序列

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和转染 在 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养人肾癌细胞系 ACHN, 使用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养 786-O。转染前 12 h 取对数生长期的肾癌细胞接种于新的 6 孔细胞培养板, 待肾癌细胞融合度为 40%~60% 进行转染, 使用 Lipofectamine 2000 作为转染试剂。6 h 后观察细胞状态并更换培养基。

1.2.3 总 RNA 的提取和 qRT-PCR 检测 p21 mRNA 的表达

转染后 72 h 收集细胞, 提取总 RNA。使用 SuperScript reverse transcriptase 反转录 RNA 为 cDNA。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参, 合成的 cDNA 使用荧光定量(qRt)PCR 试剂盒及相应引物通过 PCR 仪进行扩增检测, 结果采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 方法分析。GAPDH 引物序列: 上游 5'-TCC CAT CAC CAT CTT CCA-3', 下游 5'-CAT CAC GCC ACA GTT TCC-3'。p21 引物: 上游 5'-GCC CAG TGG ACA GCG AGC AG-3'; 下游 5'-GCC GGC GTT TGG AGT GGT AGA-3'。

1.2.4 总蛋白的提取和 Western blot 分析

转染 72 h 后收集肾癌细胞用于 p21 蛋白表达的分析。用 PBS 洗 3 次, 加入含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液, 4℃ 裂解 30 min, 高速离心 20 min, 提取总蛋白。使用 BCA protein assay kit 进行蛋白浓度测定。将每个样本提取的蛋白上样 30 μ g 蛋白至 SDS-PAGE 胶进行电泳, 使用 NC 膜转膜后用含 5% 牛血清清蛋白的 TBST 溶液室温封闭 1 h 后, 分别与一抗 β -actin(1:2 000 稀释)、p21(1:1 000 稀释)、CDK4(1:3 000 稀释)、CDK6(1:2 000 稀释)和 CyclinD1(1:1 000 稀释)在 4℃ 下孵育过夜。24 h 后使用羊抗兔/鼠二抗(1:3 000 稀释)室温下孵育 1 h, ECL 试剂曝光显影, 观察免疫反应的条带。

1.2.5 流式细胞术分析细胞周期分布 转染 72 h 后消化收集细胞, PBS 溶液洗 2 次; 70% 乙醇固定, 置 4℃ 冰箱过夜; 24 h 后 PBS 溶液洗 2 次; 使用 100 μ L RNase 在 37℃ 水浴箱孵育; 30 min 后加入 100 μ L PI 混匀, 置于 4℃ 冰箱避光孵育 30

min; 使用流式细胞仪分析记录激发波长在 488 nm 处的红色荧光。

1.2.6 多靶扫描法(MTS)细胞分析转染后肾癌细胞活力

每组设 4 个复孔, 每孔内接种 3 000 个细胞, 在 96 孔板边缘每孔内加入 200 μ L PBS 溶液减少蒸发, 转染后于第 1、2、3、4、5 天分别利用 MTS 试剂盒分析细胞活力。在每个时间点, 从培养箱内取出待检测的 96 孔细胞培养板, 弃上清液; 避光加入约 110 μ L MTS 稀释液(100 μ L 细胞培养基和 10 μ L MTS 试剂混匀), 放回 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱孵育 1~2 h; 分析前清除气泡, 酶标仪分析每孔在 490 nm 波长的吸光度(A)值, 存储数据。检测完毕后将 96 孔细胞培养板放回培养箱。

1.2.7 集落培养实验分析转染后细胞增殖能力

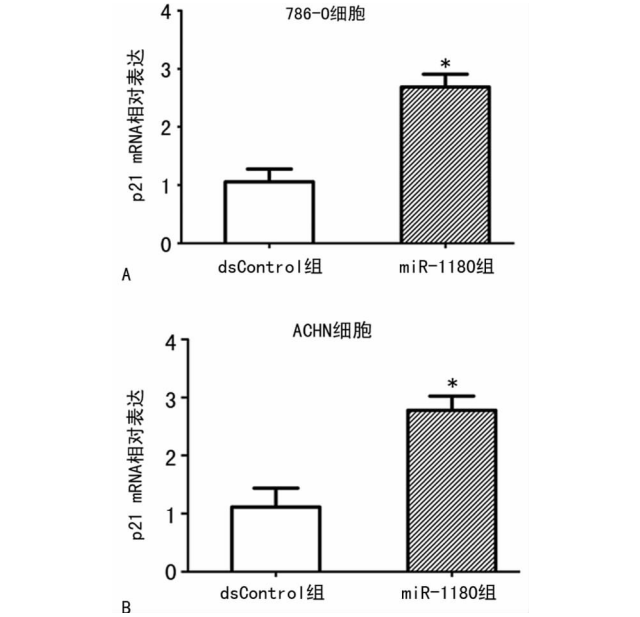
转染后 24 h, 胰酶消化收集细胞, 按 1 000 个/孔接种于 6 孔细胞培养板, 持续培养 10 余天; 弃上清液, PBS 溶液洗 2 次; 加入 1 mL 甲醇固定 15~20 min; 弃去甲醇, 使用 0.1% 结晶紫溶液固定约 30 min; 流水缓慢洗去残余结晶紫染液, 室温晾干、拍照、存储。

1.3 统计学处理 所有实验均重复 3 次以上, 采用 SPSS19.0 统计软件统计实验数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间采用 *t* 检验或单因素方差分析各组间的差异。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 qRT-PCR 检测转染后细胞 p21 mRNA 的表达

转染 miR-1180 后, 786-O 和 ACHN 细胞中 p21 mRNA 的表达较 dsControl 组分别上调 2.54 倍(*P* < 0.01)和 2.49 倍(*P* < 0.01)(图 2)。



A: 786-O 细胞; B: ACHN 细胞; *: *P* < 0.01, 与 dsControl 组比较
图 2 qRT-PCR 分析检测 p21 mRNA 相对表达量

2.2 Western blot 检测

Western blot 结果显示, miR-1180 组较 dsControl 组 p21 蛋白表达明显升高, CDK4、CDK6 和 CyclinD1 蛋白显著下调(图 3)。

2.3 流式细胞仪分析转染后肾癌细胞周期分布

相比 ds-Control 组, 转染 miR-1180 后 786-O 和 ACHN 细胞 G₀/G₁ 期细胞比例显著增加, S 期和 G₂/M 期细胞比例显著减少, 提示细胞周期被阻滞在 G₀/G₁ 期(图 5)。

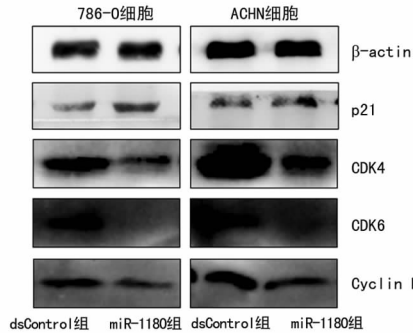
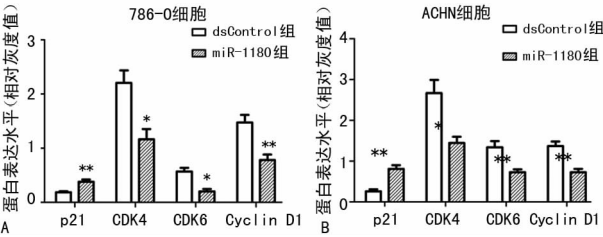
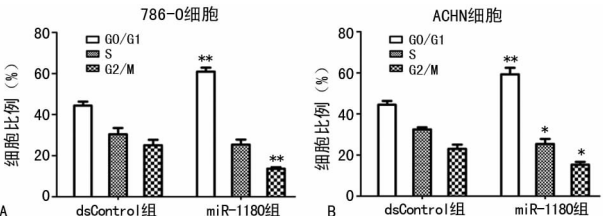


图 3 Western blot 图



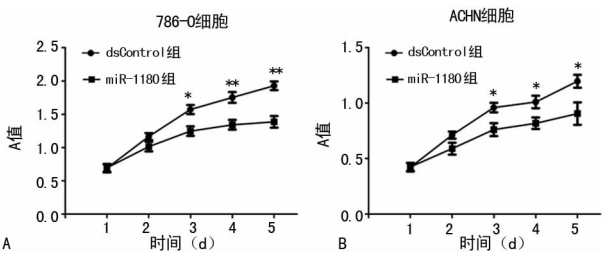
A:786-O 细胞;B:ACHN 细胞;*: $P<0.05$,**: $P<0.01$,与 ds-Control 组比较

图 4 Western blot 检测蛋白相对表达量



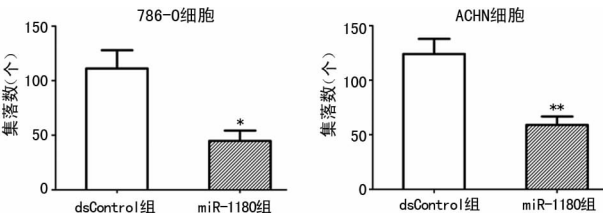
A:786-O 细胞;B:ACHN 细胞;*: $P<0.05$,**: $P<0.01$,与 ds-Control 组比较

图 5 流式细胞术检测细胞周期



A:786-O 细胞;B:ACHN 细胞;*: $P<0.05$,**: $P<0.01$,与 ds-Control 组比较

图 6 MTS 实验检测转染后肾癌细胞活力



A:786-O 细胞;B:ACHN 细胞;*: $P<0.05$,**: $P<0.01$,与 ds-Control 组比较

图 7 细胞集落培养实验检测细胞增殖能力

2.4 MTS 法检测肾癌细胞活力 相比 dsControl 组,转染

miR-1180 后肾癌细胞活力明显下降($P<0.05$)。见图 6。

2.5 集落培养实验检测转染后肾癌细胞增殖能力 相比 ds-Control 组,miR-1180 组形成的集落数显著减少($P<0.05$)。见图 7。

3 讨论

miRNAs 是一类长度约为 22 个核苷酸的非编码单链小分子 RNA,广泛参与细胞生长、分化、衰老和凋亡等多种细胞功能的改变,研究发现 miRNA 在多种肿瘤组织内存在异常表达,提示 miRNA 与肿瘤的发生、发展密切相关^[7-8]。以往研究认为,miRNA 在转录后水平通过与靶基因 mRNA 的 3'端非编码区相结合,特异性地抑制 mRNA 的翻译或者直接导致其降解,从而抑制相应基因的表达^[9]。近年研究发现,miRNA 亦能在转录水平通过作用于基因的启动子,从而显著上调基因的表达,这种现象称为 RNA 激活现象,具有 RNA 激活作用的小分子 RNA 称为小激活 RNA(saRNA)^[4,10]。近年来 RNA 激活现象在肾癌中的研究较少,因而通过激活抑癌基因表达干扰肾癌细胞的生长成为研究的重点。

p21 蛋白广泛参与多种细胞功能的调节,如细胞增殖、分化、凋亡等,具有最广泛细胞周期蛋白依赖性激酶抑制活性,可通过抑制肿瘤细胞周期的进展抑制肿瘤细胞的生长^[3]。细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)和细胞周期蛋白(Cyclin)是调控细胞周期进展的核心蛋白。CDK4 和 CDK6 可分别与 Cyclin D1 结合形成 Cyclin D1-CDK4 和 Cyclin D1-CDK6 复合物,作用于细胞周期的 G₁/S 期,导致细胞从 G₁ 期进入 S 期,促进细胞周期的进展^[11-12]。细胞周期蛋白依赖性激酶 p21 可以抑制 Cyclin D-CDK 复合物的形成或活性,从而抑制细胞进入 DNA 合成期即 S 期,引起细胞周期的停滞^[13]。miR-1180 是新近发现的一种可明显激活 p21 蛋白表达的小分子 RNA^[5],但未在肾癌细胞中进行过验证。本实验中,通过转染 miR-1180 至肾癌细胞系,发现肾癌细胞中 p21 mRNA 和相应蛋白的水平均明显升高,提示 miR-1180 具有激活肾癌细胞 p21 基因表达作用;肾癌细胞的细胞周期受到明显地抑制,肾癌细胞的活力和增殖能力明显降低,表明 miR-1180 可以显著抑制肾癌细胞的生长^[14]。有研究表明,saRNA 的激活作用与 saRNA 的浓度密切相关^[15]。本实验的不足之处在于未能证明 miR-1180 在肾癌细胞中的激活效应与 miR-1180 转染浓度之间的关系。笔者下一步将通过设置不同 miR-1180 转染浓度,验证不同浓度下 RNA 激活效应的不同,从而找出最佳的 miR-1180 转染浓度。另外,通过动物实验进一步验证 miR-1180 在体内的 p21 基因激活效应。

综上所述,miR-1180 可明显激活肾癌细胞中抑癌蛋白 p21 的表达,并显著抑制肾癌细胞的生长,有望作为新的肾癌靶基因治疗位点。

参考文献

[1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics,2015[J]. CA Cancer J Clin,2015,65(1):5-29.
[2] ESCUDIER B, PORTA C, SCHMIDINGER M, et al. Renal cell carcinoma; ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up[J]. Ann Oncol,2014, 25(Suppl 3):i49-i56.

[3] WARFEL N A,EL-DEIRY W S. p21WAF1 and tumouri-genesis;20 years after[J]. Curr Opin Oncol,2013,25(1): 52-58.

[4] WANG C,TANG K,LI Z,et al. Targeted p21(WAF1/CIP1) activation by miR-1236 inhibits cell proliferation and correlates with favorable survival in renal cell carcinoma[J]. Urol Oncol,2016,34(2):23-59.

[5] WANG C,CHEN Z,GE Q,et al. Up-regulation of p21 (WAF1/CIP1) by miRNAs and its implications in blad-der cancer cells[J]. FEBS Lett, 2014, 588 (24): 4654-4664.

[6] MIYAZAKI M,SAKAGUCHI M,AKIYAMA I,et al. Involvement of interferon regulatory factor 1 and S100C/ A11 in growth inhibition by transforming growth factor beta 1 in human hepatocellular carcinoma cells[J]. Cancer Res,2004,64(12):4155-4161.

[7] HE X X,CHANG Y,MENG F Y,et al. MicroRNA-375 targets AEG-1 in hepatocellular carcinoma and suppresses liver cancer cell growth in vitro and in vivo[J]. Oncogene, 2012,31(28):3357-3369.

[8] PIZZINI S,BISOGNIN A,MANDRUZZATO S,et al. Im-pact of microRNAs on regulatory networks and pathways in human colorectal carcinogenesis and development of metastasis[J]. BMC Genomics,2013,14(1):589.

[9] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mecha-nism,and function[J]. Cell,2004,116(2):281-297.

[10] PLACE R F,LI L C,POOKOT D,et al. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promot-er sequences[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2008,105 (5):1608-1613.

[11] SPRING L,BARDIA A,MODI S. Targeting the cyclin D- cyclin-dependent kinase (CDK) 4/6-retinoblastoma path- way with selective CDK 4/6 inhibitors in hormone recep- tor-positive breast cancer: rationale, current status, and future directions[J]. Discov Med,2016,21(113):65-74.

[12] THE I,RUIJTENBERG S,BOUCHET B P,et al. Rb and FZR1/Cdh1 determine CDK4/6-cyclin D requirement in C. elegans and human cancer cells[J]. Nat Commun, 2015,6:5906.

[13] ZHANG Q,SHIM K,WRIGHT K,et al. Atypical role of sprouty in p21 dependent inhibition of cell proliferation in colorectal cancer[J]. Mol Carcinog, 2016, 55 (9): 1355-1368.

[14] WARFEL N A,EL-DEIRY W S. p21WAF1 and tumouri-genesis;20 years after[J]. Curr Opin Oncol,2013,25(1): 52-58.

[15] WANG X,WANG J,HUANG V,et al. Induction of NANOG expression by targeting promoter sequence with small activating RNA antagonizes retinoic acid-induced differentiation[J]. Biochem J,2012,443(3):821-828.

(收稿日期:2017-09-20 修回日期:2017-11-06)

(上接第 735 页)

inflammation via modulating NF-κB and ERK signaling pathways in vitro[J]. Pharmazie,2016,71(2):101-108.

[3] CHEN J,GUO R,YAN H,et al. Naringin inhibits ROS activated MAPK pathway in high glucose induced injuries in H9c2 cardiac cells[J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2014,114(4):293-304.

[4] 刘丹,孙品兰,杨建平. 柚皮甙对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国老年学杂志,2013,33(24):6217-6219.

[5] GHIASI R,MOHAMMADI M,MAJIDINIA M,et al. The effects of mebudipine on myocardial arrhythmia in- duced by ischemia-reperfusion injury in isolated rat heart [J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2016,62(13):15-20.

[6] MENG G,WANG J,XIAO Y,et al. GYY4137 protects a- gainst myocardial ischemia and reperfusion injury by at- tenuating oxidative stress and apoptosis in rats[J]. J Bi- omed Res,2015,29(3):203-213.

[7] 周燕琼,石刚刚,高分飞,等. 碘化 N-正丁基氟哌啶醇对大鼠心肌缺血再灌注损伤血流动力学的影响[J]. 中国药理学通报,2004,20(4):449-452.

[8] 韩勇,郭立荣,孔德营,等. 20-HETE 在心肌缺血再灌注损伤中的作用及机制研究[J]. 重庆医学,2015,44(32): 4465-4468.

[9] CHEN R C,SUN G B,WANG J,et al. Naringin protects against anoxia/reoxygenation induced apoptosis in H9c2 cells via the Nrf2 signaling pathway [J]. Food Funct, 2015,6(4):1331-1344.

[10] 简春燕,郭润民,刘丹铭,等. 柚皮苷保护 H9c2 心肌细胞对抗阿霉素诱导的心肌毒性[J]. 中国药理学通报,2014, 30(2):238-243.

[11] GAUR V,AGGARWAL A,KUMAR A. Protective effect of naringin against isehemic reperfusion cerebral injury: possible neurobehavioral,biochemical and cellular altera- tions in rat brain[J]. Eur J Pharmacol,2009,616(1/3): 147-154.

[12] GURSUL C,EKINCI AKDEMIR F N,et al. Protective effect of Naringin on experimental hindlimb ischemia/ reperfusion injury in rats[J]. J Enzyme Inhib Med Chem, 2016,31(1):56-61.

(收稿日期:2017-09-22 修回日期:2017-11-08)