

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2020.02.003

过表达 miR-34a 对肾癌细胞株 769-P 生物学行为的影响

吕 川 王 超

(济宁医学院附属济宁市第一人民医院, 济宁 272011)

摘 要 **目的** 探讨 microRNA-34a(miR-34a) 外源性表达对人肾癌细胞 769-P 细胞生物学行为的影响。**方法** 建立稳定表达的空载体(NC)与 miR-34a 细胞株,分为空白对照组、NC 组、miR-34a 组,qRT-PCR 检测 miR-34a 在各肾癌细胞系中的表达水平,细胞增殖实验、Transwell 迁移实验、流式细胞周期检测观测 miR-34a 高表达后 769-P 细胞的增殖、细胞周期及迁移能力的变化情况。**结果** 与空白对照组相比,miR-34a 组细胞增殖能力降低,在 48、72h 增殖明显受到抑制,穿膜细胞数目明显减少($P<0.025$)。空白对照组、NC 组、miR-34a 组迁出细胞数分别为:(382.18 ± 37.84)、(398.57 ± 24.09)、(103.73 ± 17.36)个,差异具有统计学意义($P<0.05$)。空白对照组、NC 组、miR-34a 组 S 期的细胞比例分别为(37.31 ± 2.12)%、(35.96 ± 1.78)%、(57.24 ± 2.67)%,miR-34a 组 S 期的细胞比例比另两组显著升高($P<0.025$)。**结论** miR-34a 在生物学行为上可降低肾癌细胞的恶性进展,有望在未来肾癌靶向治疗中发挥抑癌基因作用。

关键词 miR-34a;肾癌;增殖;迁移

中图分类号:R737.11 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2020)04-087-04

The effect of overexpression of miR-34a on the biological behavior of renal cancer cell line 769-P

LV Chuan, WANG Chao

(Jining NO. 1 People's Hospital & the Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining 272011, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of exogenous expression of microRNA-34a on the biological behavior of human renal cancer cell line 769-P. **Methods** The stable expression of 769-P/NC and 769-P/miR-34a cell lines were established by infecting 769-P with miR-34a expression lentivirus vector and control. They were divided into three groups: 769-P, 769-P/NC and 769-P/miR-34a. The expression of miR-34a in renal cancer cell lines was detected by real-time quantitative reverse transcriptase polymerase reaction (qRT-PCR). The proliferation, cell cycle and migration ability of 769-P cells were detected by cell proliferation, transwell migration and flow cytometry. **Results** Compared with the control group, the overexpression of miR-34a decreased the proliferation of 769-P/miR-34a cells at 48h and 72h ($P<0.05$), and the number of transmembrane cells decreased significantly. The cell counts of 769-P, 769-P/NC and 769-P/miR-34a were 382.18 ± 37.84 , 398.57 ± 24.09 and 103.73 ± 17.36 ($P<0.01$). The percentage of S-phase cells in 769-P/miR-34a group was significantly higher than that in the other two groups, which were (37.31 ± 2.12)%, (35.96 ± 1.78)% and (57.24 ± 2.67)%, respectively. **Conclusion** MiR-34a is expected to play a role of tumor suppressor gene in targeted therapy of renal cancer in the future.

Keywords: miR-34a; Renal cancer; Cell proliferation; Migration

肾癌是泌尿系统最常见的肿瘤之一,约占人类恶性肿瘤的 3%。近年来,肾癌患病率逐年增高,且人群呈年轻化趋势。由于肾癌对放化疗皆不敏感,外科手术已成为治疗肾癌的主要手段,但对

于转移性和高危肾癌患者的治疗效果仍不理想。肾癌中透明细胞癌作为最常见的类型,约占肾癌的 80%。目前,关于肾透明细胞癌的侵袭和转移的治疗依然面临许多困难。因此,透明细胞癌的靶

向治疗可能为提高肾癌预后带来新的希望。

miR-34a 是受肿瘤抑制基因 p53 调控的具有肿瘤抑制作用的 miRNA, 对肿瘤细胞周期阻滞、凋亡、细胞生长抑制以及肿瘤干细胞抑制等发挥重要作用^[1-2]。本研究通过病毒感染肾透明细胞癌细胞 769-P, 过表达其 miR-34a 水平, 探讨 miR-34a 对 769-P 细胞增殖、迁移能力及细胞周期等生物学行为的影响, 为研究肾透明细胞癌靶向治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人肾癌细胞株 769-P、786-O、ACHN、OSRC 来源于西安交通大学泌尿外科研究所, 慢病毒载体 miR-NC 和 miR-34a 由上海吉玛制药技术有限公司合成, RMP11640 培养基购自 Gibco 公司, 胎牛血清购自 Hyclone 公司, PrimeScript miRNA cDNA Synthesis Kit、SYBR Premix Ex TaqII 购自 TaKaRa 公司, Trizol 试剂及 miR-34a 实时定量 PCR 引物购自北京天根生化科技有限公司, 细胞周期检测试剂盒购自碧云天生物技术研究所, Transwell 小室(孔径 8μm)购自 MILLIPORE 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 人肾癌细胞株 769-P、786-O、ACHN、OSRC 用含 10% 胎牛血清的 RMP11640 培养基, 在 37℃、5% CO₂ 恒温孵育箱中培养, 细胞对数生长期传代。将对照载体与 miR-34a 表达慢病毒载体感染 769-P, 建立稳定表达空载体(NC)与 miR-34a 的细胞株, 实验分为空白对照组、NC 组、miR-34a 组。

1.2.2 转染实验 取对数生长期 769-P 细胞传代, 接种于 6 孔培养板, 每孔接种 $2 \sim 3 \times 10^5$ 个/ml 769-P 细胞, 待细胞密度约 70% 时, 取慢病毒滴度液 NC 和 miR-34a 10μl 和 20μl 感染细胞, 并加入 polybrene 增加感染效率。24h 后弃去慢病毒培养液换成正常培养液。倒置荧光显微镜观察绿色荧光检测感染效率。

1.2.3 qRT-PCR 提取细胞总 RNA。反转录成 cDNA, 反应体系 20μl。PCR 反应以 U6RNA 为内参, 其引物为 U6-forward 5'-CTCGCTTCGGCAGCA-CA-3' 和 U6-reverse 5'-AACGCTTCACGAATTT-GCGT-3', miR-34a 实时定量 PCR 引物序列为 miR-34a-forward 5'-TGCCAGTGTCTTAGCTGGT-

GT-3' 和 miR-34a-reverse 5'-GCCAGCACAGAAT-TAATACGAC-3'。实时荧光定量 PCR 仪进行 PCR 扩增及分析, 设置 3 个复孔, 独立重复实验 3 次。

1.2.4 细胞增殖实验 将空白对照组、NC 组及 miR-34a 组对数期生长细胞用胰酶消化, 培养基稀释成 5×10^5 个/ml, 取 4 块 96 孔板, 分别标记 0、24、48、72h, 每组细胞设置 6 个复孔。Gen5 酶标仪检测 490nm 下吸光度值, 并依据结果制作生长曲线, 抑制率(IR) 计算: $(1 - \text{miR-34a 组} / \text{空白对照组}) \times 100\%$, 独立重复实验 3 次。

1.2.5 Transwell 迁移实验 取空白对照组、NC 组及 miR-34a 组对数生长期细胞 200μl/组接种于 Transwell (8μm) 上室, 下室加入 800μl 10% 胎牛血清 RMP11640 培养基, 每组细胞设置 3 个复室, 置于 37℃ 培养箱孵育 24h, 固定染色, 显微镜下随机取 5 个视野计数并拍照。

1.2.6 细胞周期实验 将空白对照组、NC 组及 miR-34a 组对数期生长细胞用加入预冷的 70% 乙醇, 置于 4℃ 固定过夜, 离心并 PBS 洗涤后加入含 50μg/ml 溴化乙锭(PI)、100μg/ml RNase A、0.2% Triton X-100 的 500μl PBS, 4℃ 避光环境下孵育 30min, 流式细胞仪检测各组细胞周期。

1.3 统计学方法

应用统计学软件 SPSS17.0 进行双向方差分析和双尾 *t* 检验, 得到的数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 双尾 *t* 检验水准以 $P < 0.025$ 为统计学差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-34a 在各肾癌细胞株中相对表达水平

选取 4 种人肾癌细胞株 769-P、786-O、ACHN、OSRC 进行实验, 其中 769-P 细胞 miR-34a 表达量在 4 种肾癌细胞株中最低(图 1), 因此, 选取肾透明细胞癌细胞株 769-P 作为研究对象, 观察过表达 miR-34a 后 769-P 细胞生物学行为的改变。

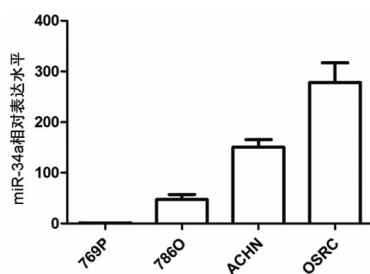
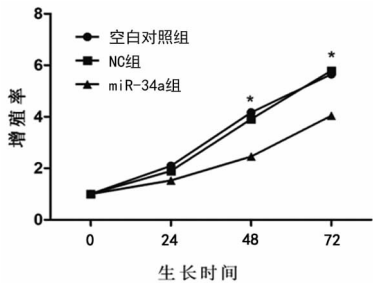


图 1 miR-34a 在各肾癌细胞系中的表达

2.2 过表达 miR-34a 对 769-P 细胞增殖的影响

过表达 miR-34a 后,miR-34a 组细胞增殖能力降低,在 48h、72h 增殖明显受到抑制($P<0.025$)。见图 2。

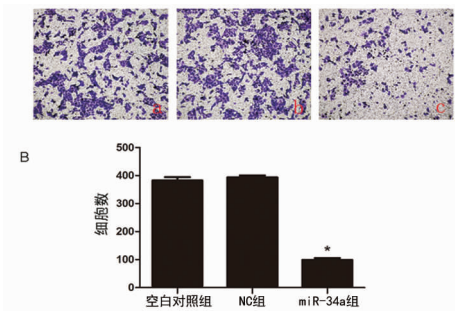


注:与空白对照组、NC 组比较, * $P<0.025$

图 2 miR-34a 对 769-P 细胞增殖的影响

2.3 过表达 miR-34a 对 769-P 细胞迁移能力的影响

miR-34a 组与空白对照组及 NC 组细胞相比,穿膜细胞数目明显减少($P<0.025$)。3 组迁出细胞数分别为:(382.18 ± 37.84)、(398.57 ± 24.09)和(103.73 ± 17.36)个。见图 3。

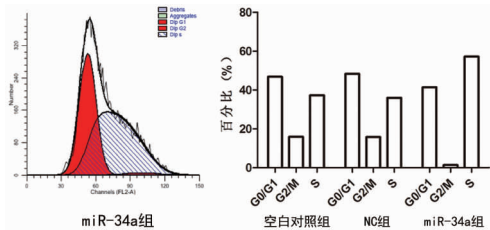
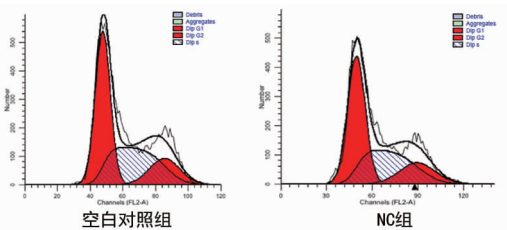


注:Aa. 空白对照组,Ab. NC 组,Ac. miR-34a 组
与空白对照、NC 两组比较, * $P<0.025$

图 3 过表达 miR-34a 对 769-P 细胞迁移能力的影响

2.4 过表达 miR-34a 对 769-P 细胞周期的影响

空白对照组、NC 组和 miR-34a 组 S 期细胞比例分别为(37.31 ± 2.12)%、(35.96 ± 1.78)%、(57.24 ± 2.67)%,miR-34a 组 S 期细胞比例比另两组显著升高($P<0.025$),表明 miR-34a 可将 769-P 细胞周期阻滞于 S 期。见图 4。



注:与空白对照组、NC 组比较, * $P<0.025$

图 4 miR-34a 对细胞周期的影响

3 讨论

目前,关于透明细胞癌的侵袭和转移的治疗依然面临许多困难,也是肾癌致死的主要原因之一。治疗肾癌的主要方法是手术治疗,但针对肾癌的辅助治疗和靶向治疗也日益受到推崇,这可能是未来研究的主要方向^[3]。

miR-34a 作为肿瘤抑制物在人类多种肿瘤组织和细胞中低表达^[4-5]。与正常邻近肾脏组织相比,80%肾癌组织中 miR-34a 显著下调^[6]。肿瘤细胞的增殖在很大程度上破坏了正常细胞组织,从而促进肿瘤的进展。目前 miR-34a 在肿瘤中失调的机制仍未明确。很多证据表明 CpG 甲基化导致的转录沉默在肿瘤抑制基因失活过程中发挥作用,同时可能促进细胞具有选择优势的克隆生长^[7]。本文结果显示过表达 miR-34a 显著抑制 769-P 细胞的增殖,提示 miR-34a 有可能成为肾透明细胞癌治疗的新靶点。

肿瘤细胞的恶性程度与其本身迁移能力的强弱有一定的关系,细胞的迁移能力受多种细胞信号通路的介导,miR-34a 可通过靶向调节多种致癌基因,如 c-Met、Bcl-2、E2F3、Notch1 等介导调节细胞的侵袭和迁移,从而发挥抑癌作用^[8]。本文结果显示 miR-34a 对肾癌细胞株 769-P 细胞的迁移有明显抑制作用,由此推测,miR-34a 可通过靶向多种癌基因参与了抑制 769-P 细胞迁移的作用。

细胞周期的调控也是恶性肿瘤的生物学特征之一,细胞周期依赖激酶和细胞周期蛋白在 G1/S 期、G2/M 期及 S 期起到了关键作用^[9],本实验通过 miR-34a 过表达建立稳定感染的细胞株,发现 miR-34a 组 S 期的细胞比例显著高于空白对照组,表明 miR-34a 可通过诱导细胞周期停止在 S 期,发挥抑制细胞增殖的作用。

综上所述,miR-34a 转染肾癌 769-P 细胞可抑制其增殖、迁移,可为肾癌基因(下转第 093 页)

- (8): 622-623. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1001-9391. 2013. 08. 023.
- [2] Vyskocil A, Leroux T, Truchon G, et al. Occupational ototoxicity of n-hexane[J]. Hum Exp Toxicol, 2008, 27(6): 471-476. DOI: 10. 1177/0960327108093719.
- [3] Puri V, Gupta AD, Chaudhry N, et al. Reversible cerebral and brain stem dysfunction in n-Hexane neuropathy. [J]. Ann Indian Acad Neurol, 2015, 18(4): 464-467. DOI: 10. 4103/0972-2327. 160088.
- [4] 高俊发, 张秀英, 林青, 等. 正己烷染毒小鼠学习记忆能力与脑组织神经生长因子及其手提表达的变化[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2019, 37(3): 217-220. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 100-9391. 2019. 03. 013.
- [5] 樊春月, 黄汉林, 陈嘉斌, 等. 38 例职业性慢性正己烷中毒的临床及神经-肌电图特点[J]. 中国工业医学杂志, 2016, 29(5): 323-328. DOI: 10. 13631/j. cnki. zgggyx. 2016. 05. 001.
- [6] Asaduzzaman AK, Chun BS. Characterization of digestive enzymes from de-oiled mackerel (*Scomber japonicus*) muscle obtained by supercritical carbon dioxide and n-hexane extraction as a comparative study[J]. J Food Sci Technol, 2015, 52(6): 3494-3503. DOI: 10. 1007/s13197-014-1408-5.
- [7] 付玉环, 姜广建, 夏庆安, 等. 线粒体融合蛋白 Mfn1/2 的结构和功能[J]. 生命的化学, 2007, 27(6): 511-513.
- [8] Zhang Z, Sliter DA, Bleck CKE, et al. Fis1 deficiencies differentially affect mitochondrial quality in skeletal muscle[J]. Mitochondrion, 2019, 49: 217-226. DOI: 10. 1016/j. mito. 2019. 09. 005.
- [9] Yu R, Jin SB, Lendahl U, et al. Human Fis1 regulates mitochondrial dynamics through inhibition of the fusion machinery[J]. EMBO J, 2019, 38(8): e99748. DOI: 10. 15252/embj. 201899748.
- [10] 孙卫东, 刘晓然, 姜宁, 等. 骨骼肌线粒体对细胞能量需求的快速应答: mfn1/2 与 fis1 基因在急性运动中的动态表达[J]. 中国运动医学杂志, 2008, 27(5): 544-550. DOI: 10. 16038/j. 1000-6710. 2008. 05. 013.
- [11] 赵斐, 靳庆勋, 乔海荣, 等. 有氧运动改善高脂膳食诱导的胰岛素抵抗: 增强骨骼肌线粒体融合与分裂及功能[J]. 中国运动医学杂志, 2012, 31(1): 24-30. DOI: 10. 16038/j. 1000-6710. 2012. 01. 006.
- [12] 王雅一. 大鼠骨骼肌超微结构及恢复因子的变化[J]. 体育科学研究, 2014, 18(3): 62-65. DOI: 10. 19715/j. tiyukexueyanjiu. 2014. 03. 014.
- [13] Bigler M, Koutsantonis D, Odriozola A, et al. Morphometry of skeletal muscle capillaries: the relationship between capillary ultrastructure and ageing in humans[J]. Acta Physiol (Oxf), 2016, 218(2): 98-111. DOI: 10. 1111/apha. 12709.
- [14] Rengo JL, Callahan DM, Savage PD, et al. Skeletal muscle ultrastructure and function in statin-tolerant individuals[J]. Muscle Nerve, 2016, 53(2): 242-251. DOI: 10. 1002/mus. 24722.

(收稿日期 2019-12-05)

(本文编辑: 石俊强)

(上接第 089 页) 治疗提供新的思路。

参考文献:

- [1] Dimopoulos K, Gimsing P, Gr Nbaek K. Aberrant microRNA expression in multiple myeloma[J]. Eur J Haematol, 2013, 91(2): 95-105. DOI: 10. 1111/ejh. 12124.
- [2] Yu G, Li H, Wang J, et al. MiRNA-34a suppresses cell proliferation and metastasis by targeting CD44 in human renal carcinoma cells[J]. J Urol, 2014, 192(4): 1229-1237. DOI: 10. 1016/j. juro. 2014. 05. 094.
- [3] Haas NB, Uzzo R. Adjuvant therapy for renal cell carcinoma[J]. Curr Oncol Rep, 2008, 10(3): 245-252.
- [4] Li Y, Guessous F, Zhang Y, et al. MicroRNA-34a inhibits glioblastoma growth by targeting multiple oncogenes[J]. Cancer Res, 2009, 69(19): 7569-7576. DOI: 10. 1158/0008-5472. CAN-09-0529.
- [5] Wiggins JF, Ruffino L, Kelnar K, et al. Development of a lung cancer therapeutic based on the tumor suppressor microRNA-34[J]. Cancer Res, 2010, 70(14): 5923-5930. DOI: 10. 1158/0008-5472. CAN-10-0655.
- [6] Zhang C, Mo R, Yin B, et al. Tumor suppressor microRNA-34a inhibits cell proliferation by targeting Notch1 in renal cell carcinoma[J]. Oncol Lett, 2014, 7(5): 1689-1694.
- [7] 姚志勇, 张超, 马鑫, 等. microRNA-34a 的表达对膀胱癌细胞系 J82 生物学行为的影响[J]. 临床泌尿外科杂志, 2012(1): 70-73.
- [8] 张颖, 张超. MicroRNA-34a 对尿路上皮癌细胞株 5637 细胞迁移、侵袭和增殖的影响[J]. 海南医学, 2013, 24(22): 3277-3280.
- [9] 王传卓, 辛鹤, 刘波, 等. miR-34a 对人结肠癌 SW480 细胞增殖、凋亡、细胞周期及皮下移植瘤生长的影响[J]. 实用医学杂志, 2018(1): 2648-2652.

(收稿日期 2020-01-09)

(本文编辑: 石俊强)