

泌尿生殖器肿瘤

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002527

环状非编码 RNA hsa_circ_001842 对肾癌细胞增殖、凋亡、侵袭和成瘤能力的影响

冯倩¹, 李园梦², 曾家伟³, 王耀东⁴, 谢刚⁵, 杨渝伟³, 俸家富³

(1. 成都中医药大学医学技术学院, 成都 611137; 2. 西南医科大学附属医院医学检验部, 泸州 646000; 绵阳市中心医院 3. 检验科; 4. 泌尿外科; 5. 病理科, 绵阳 621000)

【摘要】目的:探究环状非编码 RNA hsa_circ_001842 作为癌基因在肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)患者肾癌组织及细胞中的表达情况, 以及其对肾癌细胞增殖、凋亡、侵袭与成瘤能力的影响。**方法:**收集 2018 年 9 月至 2019 年 10 月绵阳市中心医院泌尿外科进行手术切除的肾癌标本及癌旁组织标本各 64 例。利用 qRT-PCR 检测所有 RCC 组织与癌旁正常组织中 hsa_circ_001842 的表达情况。将 Caki-1 肾癌细胞分别转染 hsa_circ_001842 基因过表达质粒(ox-circ_001842)、沉默质粒(sh-circ_001842)和空质粒(ox-NC 和 sh-NC), 采用细胞克隆形成实验、流式细胞术、细胞划痕实验和细胞侵袭实验, 检测 hsa_circ_001842 对肾癌细胞增殖凋亡和迁移侵袭能力的影响。使用 Western blot 检测各组肾癌细胞上皮间充质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)相关蛋白与 MMP-9 蛋白表达水平。将转染 sh-NC 和 sh-circ_001842 的 Caki-1 肾癌细胞分别接种于裸鼠皮下, 每 7 天测量一次肿瘤体积及体质量, 4 周后处死各组小鼠, 并使用免疫组化技术和 qRT-PCR 检测肿瘤组织中 EMT 相关蛋白的表达情况。**结果:**RCC 患者肾癌组织中 hsa_circ_001842 的表达量明显高于癌旁正常组织($P<0.05$)。体外实验表明, 与 ox-NC 组和 sh-circ_001842 组相比, ox-circ_001842 组和 sh-NC 组 Caki-1 肾癌细胞的集落形成率、划痕愈合比率、细胞侵袭能力和 E-cadherin 蛋白的表达均明显增加($P<0.05$), 而细胞凋亡率、N-cadherin 和 MMP-9 蛋白的表达明显降低($P<0.05$)。裸鼠成瘤实验表明, 与 sh-NC 组相比, sh-circ_001842 组裸鼠形成的肿瘤体积和体质量均小于 sh-NC 组形成的肿瘤($P<0.05$), 并且 E-cadherin 蛋白表达水平明显上升, N-cadherin 蛋白表达水平明显下降($P<0.05$)。**结论:**hsa_circ_001842 在肾癌组织及细胞中表达上调, 抑制 hsa_circ_001842 的表达可以抑制癌细胞的增殖、迁移、侵袭和成瘤能力。

【关键词】肾细胞癌; circular RNA; hsa_circ_001842; 增殖; 迁移; 侵袭**【中图分类号】**R692**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2020-02-17

Effects of circular non-coding RNA hsa_circ_001842 on proliferation, apoptosis, invasion and tumorigenicity of renal cancer cells

Feng Qian¹, Li Yuanmeng², Zeng Jiawei³, Wang Yaodong⁴, Xie Gang⁵, Yang Yuwei³, Feng Jiafu³

(1. College of Medical Technology, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine;

2. Department of Medical Laboratory, Affiliated Hospital of Southwest Medical University;

3. Department of Clinical Laboratory; 4. Department of Urology Surgery;

5. Department of Pathology, Mianyang Central Hospital)

【Abstract】Objective: To investigate the expression of circular non-coding RNA hsa_circ_001842 as an oncogene in renal cancer tissues and renal cells of patients with renal cell carcinoma(RCC), and to investigate its effects on the proliferation, apoptosis, invasion and tumorigenicity. **Methods:** A total of 64 cases of renal cancer specimens and adjacent tissue specimens resected from September 2018

作者介绍: 冯倩, Email: fqfengqian@foxmail.com,

研究方向: 临床检验诊断学。

通信作者: 俸家富, Email: jiafufeng@aliyun.com。

基金项目: 国家重点基础研究发展(973)计划子课题资助项目(编号: 2015CB755400-043); 四川省科技厅科技支撑计划资助项目(编号: 2015SZ0117、2019YJ0701)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20200611.1708.007.html>

(2020-06-11)

to October 2019 in Mianyang Central Hospital were collected. The qRT-PCR was used to detect the expression of all RCC tissues and adjacent normal tissues. Caki-1 kidney cancer cells were divided into ox-NC group(transfected with over-expressing empty plasmid), ox-circ_001842 group(transfected with circ_001842 over-expression plasmid), sh-NC group(transfected with silent empty plasmid), and sh-circ_001842 group(trans-

fectected with circ_001842 silencing plasmid). Cell clone formation experiment, flow cytometry, cell scratch test and cell invasion experiment were used to detect the effect of hsa_circ_001842 on the proliferation, apoptosis, migration and invasion of RCCs. Western blot was used to detect the expression of epithelial mesenchymal transition(EMT)-related protein and MMP-9 protein in RCCs. Caki-1 cells transfected with sh-NC and sh-circ_001842 were inoculated subcutaneously in nude mice, and tumor volume and weight were measured every 7 days. Mice in each group were executed after 4 weeks and immunohistochemical techniques and qRT-PCR were used to detect the expression of EMT-related proteins in tumor tissues. **Results:** The expression of hsa_circ_001842 in renal cancer tissues of renal cell carcinoma patients was significantly higher than that in normal adjacent tissues ($P<0.05$). Compared with the ox-NC group and the sh-circ_001842 group, the Caki-1 renal cell's colony formation rate, wound healing ratio, cell invasion ability and E-cadherin protein in the ox-circ_001842 group and the sh-NC group were significantly increased ($P<0.05$), while the apoptosis rate, N-cadherin and MMP-9 protein expression were significantly reduced ($P<0.05$). Nude tumor formation experiments showed that the tumor volume and weight in the sh-circ_001842 group were smaller than those in the sh-NC group ($P<0.05$), and the expression level of E-cadherin protein increased significantly, while expression level of N-cadherin protein was decreased significantly ($P<0.05$). **Conclusion:** Expression of hsa_circ_001842 in renal cancer tissues and cells is up-regulated, inhibiting the proliferation, migration, invasion and tumorigenicity by inhibiting the expression of hsa_circ_001842.

[Key words] renal cell carcinoma; circular RNA; hsa_circ_001842; proliferation; migration; invasion

肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)是常见的泌尿系统恶性肿瘤之一。有关新增癌症病例的统计显示, RCC 约占所有癌症的 4%^[1]。有研究显示, RCC 在欧洲尤其是西欧的年龄标准化死亡率(age standardised rate, ASR)最高, 约为 16.7/10 万人; 而我国 RCC 的 ASR 为 3.8/10 万人^[2]。许多 RCC 患者在疾病早期无典型症状, 半数以上的 RCC 患者是因其他病因行超声、CT 或 MR 等影像学检查时偶然发现的。近年来, RCC 的治疗已从非特异性免疫方法过渡到有针对性的血管内皮生长因子靶向治疗, 现又向新型免疫剂治疗转变^[3]。尽管 RCC 的治疗取得了一定进展, 且通过根治性肾切除手术治疗可降低 RCC 死亡率, 但有研究称肿瘤大小是其术后肾功能滤过功能恢复的重要因素^[4]。若是能在疾病早期发现, 有利于患者术后肾功能的恢复。

环状 RNA(circ RNA)是一类新型的内源性非编码 RNA, 在基因调控中被称为关键调控因子。尽管环状 RNA 的产生和功能机制尚不完全清楚, 但最近的研究表明环状 RNA 与多种疾病相关, 在多种类型肿瘤(肺癌^[5]、胃癌^[6]、膀胱癌^[7]、乳腺癌^[8]等)组织中异常表达。许多学者认为, circRNA 有望成为这些疾病诊断和治疗的潜在分子标记物。有研究发现, circ_0039569 在 RCC 细胞生长和转移中起重要作用, circ_0039569 可通过调节 miR-34a-5p/CCL22 轴促进 RCC 细胞增殖和转移^[9]。若敲除 hsa_circ_

0001451, 可明显促进体外肿瘤的生长^[10]。基于这些原因, 本研究旨在确定 hsa_circ_001842 在 RCC 发生发展中所起作用, 为 RCC 的机制研究提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 病理组织样本 选取绵阳市中心医院泌尿外科 2018 年 9 月至 2019 年 10 月进行根治性肾切除及肾脏部分切除手术的患者, 共 64 例, 其中男性 41 例, 年龄 37~76 (52.95 ± 1.19) 岁; 女性 23 例, 年龄 41~66 (51.22 ± 1.25) 岁。纳入标准: ①患者术后标本病理诊断为 RCC; ②进行肾部分组织切除或肾全切除手术; ③手术治疗前未进行化疗和免疫等抗肿瘤抗炎治疗。分别取患者肿瘤组织和癌旁肾脏正常组织样本, 并保存于 -80℃ 冰箱中, 用于基因表达和切片检测。本研究所有病例均获得患者知情同意, 并经绵阳市中心医院伦理委员会批准。

1.1.2 实验动物 购买 32 只 4~5 周龄 SPF 级雄性裸鼠, 体重 16~20 g, 购买于上海斯莱克实验动物有限责任公司, 用作成瘤实验。上述实验动物均用于医学研究, 所有操作均经本院动物委员会讨论批准后进行。

1.1.3 细胞及试剂 人肾癌细胞株 Caki-1、769-P、OSRC-2、ACHN 和人正常近端肾小管上皮细胞株 HK-2(美国 ATCC 公司); Trizol 裂解液、Lipofectamine™2000 转染试剂盒、GIMSA 染液和 Opti-MEM 培养基(美国 Invitrogen 公司); RNA 反转录试剂盒(日本 TOYOBO 公司); PCR 引物(上海生工生物工程); 荧光定量 PCR(qRT-PCR)试剂盒(中国 GenStar 公司); 转染质粒(中国 Sino biological 公司); AnnexinV-FITC Apop-

osis Detection Kit I 细胞凋亡试剂盒(美国 BD 公司);RIPA 裂解液(中国 Beyotime Biotechnology 公司);一抗(中国 Abcam 公司);IgG 二抗(美国 Santa Cruz 公司);ECL 反应液(美国 Thermo Fisher 公司);牛血清白蛋白、TritonX-100 与 Matrigel 基质胶(美国 Sigma 公司);Transwell 小室(美国 Corning 公司);GFPSpark®慢病毒(美国 Sino biological 公司);RPMI 1640 培养基(美国 Gibco 公司)。

1.1.4 仪器与软件 电动组织研磨器(中国 TIANGEN 公司);NANO DROP 2000 分光光度计(美国 Thermo 公司);ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪、ChemiDoc™ 成像系统(美国 Bio-Rad 公司);FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司);ImageJ2x 2.2.4.7 软件、Image-Pro Plus 6.0 软件、SPSS 25.0 统计学软件。

1.2 实验方法

1.2.1 引物的设计 hsa_circ_001842、E-cadherin、N-cadherin、MMP-9 和 GAPDH 引物由上海生物技术公司合成^[11-12](表 1)。hsa_circ_001842、E-cadherin、N-cadherin 和 MMP-9 的相对表达水平以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量法计算 mRNA 的相对表达量; $\Delta C_t = C_{t_{\text{目的基因}}} - C_{t_{\text{GAPDH}}}$,目的基因 mRNA 的相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。

表 1 qRT-PCR 引物序列

名称	序列
hsa_circ_001842-F	5'-AATGCTGAAACTGCTGAGAGAA-3'
hsa_circ_001842-R	5'-TTGAGAAAACGAGTGCTTTGG-3'
E-cadherin-F	5'-CCCTCGACACCCGATTCAAA-3'
E-cadherin-R	5'-TCTGTAGGTGGAGTCCCAGG-3'
N-cadherin-F	5'-CTGTCCCGGCGTCTTC-3'
N-cadherin-R	5'-GATGGCGCTCCCCAAGAG-3'
MMP9-F	5'-CCTGGGCAGATTCCAAACCT-3'
MMP9-R	5'-GTACACGCGAGTGAAGGTGA-3'
GAPDH-F	5'-GCAAACAAGCAGGATCAGCAA-3'
GAPDH-R	5'-CCCATCCTTGCCCTTGCTAA-3'

1.2.2 RNA 提取与 qPCR 检测 采用 Trizol 抽提法抽提人肾细胞癌肿瘤组织与癌旁肾脏正常组织,人肾癌细胞株 Caki-1、769-P、OSRC-2、ACHN 和人正常近端肾小管上皮细胞株 HK-2 中的总 RNA,使用分光光度计测定 RNA 浓度;使用 ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover 试剂盒并按说明书操作将 RNA 逆转录合成 cDNA,以 cDNA 为模板,按照 2xRealStar Green Mixture 试剂盒说明书进行 qRT-PCR 操作,并使用 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪测定。

1.2.3 细胞转染 根据 qRT-PCR 结果选择 Caki-1 肾癌细胞用于后续试验。将 Caki-1 肾癌细胞分为 ox-NC 组(转染过表达空质粒)、ox-circ_001842 组(转染 circ_001842 过表达质粒)、sh-NC 组(转染沉默空质粒)和 sh-circ_001842 组(转染 circ_001842 沉默质粒)。按 Lipofertamine 2000 试剂盒说明书要求对 Caki-1 肾癌细胞进行转染。

1.2.4 平板细胞克隆形成实验 取对数生长期的 Caki-1 肾癌细胞,用 0.25%胰蛋白酶消化成单细胞悬液,并调整细胞浓度为 1×10^6 个/L。每组细胞分别以 50、100、200 个/皿的梯度密度接种于含 10 mL 37 °C 预热培养液的培养皿中,置于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养 2~3 周。当培养皿中观察到肉眼可见的集落时,终止培养。弃去上清液,用磷酸盐缓冲盐水浸洗 2 次后,使用 4%多聚甲醛固定细胞,15 min 后弃固定液,用吉姆萨染色液染 10~30 min,用流水洗去染色液,待空气干燥后,把培养皿放置在倒置显微镜下,观察细胞克隆数。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡情况 采用 AnnexinV-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡,按 AnnexinV-FITC Apoptosis Detection Kit I 细胞凋亡试剂盒说明书处理细胞,并使用 FACSCalibur 流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.2.6 细胞侵袭实验 置 Caki-1 肾癌细胞于无血清培养基中饥饿 24 h,用含 10 g/L 牛血清蛋白的 Opti-MEMI 培养基重悬细胞,调整细胞浓度为 3×10^4 个/mL。在 Transwell 小室中加入 100 μ L 细胞悬液,小室下层滴加 600 μ L 10% RPMI1640 培养基。在迁移试验时,培养 48 h 后用 4%多聚甲醛固定 30 min 后,使用 0.2% TritonX-100 溶液处理 15 min,0.05% 龙胆紫染 5 min。在侵袭实验时,实验前在小室加入 50 μ L Matrigel 基质胶,48 h 后采用上述方法进行固定与染色。最后于倒置显微镜下对染色细胞进行计数。

1.2.7 细胞划痕实验 在 6 孔板的每孔中加入 5×10^5 个转染 48 h 后的 Caki-1 肾癌细胞,待细胞完全贴壁后,用枪头在每孔中制造直径约 2 mm 的划痕,培养 24 h。分别于细胞划痕后 0 h 和 24 h 进行拍照,并用 Image-Pro Plus 6.0 软件计算划痕愈合率。

1.2.8 Western blot 检测蛋白表达水平 收集各组 Caki-1 肾癌细胞,按照 BCA 蛋白质检测试剂盒说明书操作检测样品蛋白浓度。配制 4%浓缩胶和 10%聚丙烯酰胺分离胶,加入蛋白样品,电泳后转移到 PVDF 膜上。将 PVDF 膜于 5%脱脂奶粉封闭液室温封闭 1 h,一抗 4 °C 孵育过夜,二抗室温孵育 1 h 后,ECL 显影,使用 Bio-Rad ChemiDoc™ 成像系统观察结果。以 GAPDH 做内参,利用 ImageJ2x 软件对蛋白印迹图像进行分析。

1.2.9 裸鼠皮下成瘤实验 GFPSpark®慢病毒包被各组质粒后,按照 MOI=40、80 或 100 分别侵染 Caki-1 肾癌细胞,48 h 后荧光显微镜观察,选取稳定细胞系用于后续实验。用 RPMI 1640 培养基重悬 Caki-1 肾癌细胞至 1×10^6 个/ μ L。将 32 只裸鼠随机分为 2 组,每组 16 只,成瘤实验为期 4 周。裸鼠经乙醚麻醉后,将 Caki-1 肾癌细胞(ox-NC 和 ox-circ_001842)接种于各组裸鼠右后腿背部皮下,每 7 天测量 1 次肿瘤长宽,并计算体积。

1.2.10 免疫组化实验 对肿瘤组织进行石蜡包埋后切片 5 μ m。常规脱蜡与水化后,在柠檬酸盐缓冲液中进行抗原微波热修复,使用 1%BSA 封闭液室温封闭 1 h,一抗(E-cadherin,兔来源,1:300;N-cadherin,兔来源,1:300)中 4 °C 孵

育过夜。PBS 洗涤后 HRP-标记的抗兔二抗室温孵育 1 h, DAB 显色后用自来水终止显色反应。苏木素染核后酒精梯度脱水,封片镜检。

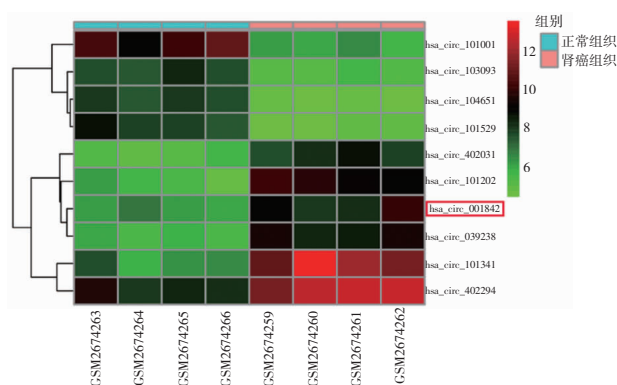
1.3 统计学处理

所有数据均采用 SPSS 25.0 统计软件进行处理。结果以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。RCC 患者肾癌组织及癌旁正常组织的比较采用配对 t 检验,其他 2 组间比较采用独立样本 t 检验。采用 Kaplan-Meier 法计算患者的生存率。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

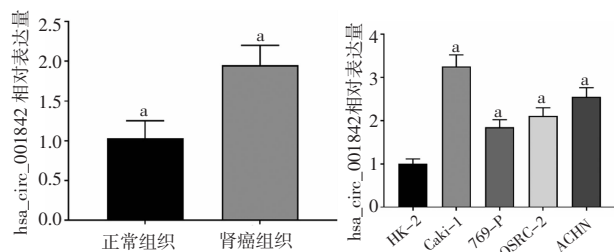
2 结果

2.1 hsa_circ_001842 在肾癌组织及细胞中表达上调

使用 R 语言对肾癌 GSE100186 芯片进行差异分析,前 10 个差异 circ RNA 的表达热图如图 1A 所示。与正常组织相比,hsa_circ_001842 在 RCC 组织中表达上调。使用 qRT-PCR 检测 64 例 RCC 组织与正常组织的 hsa_circ_001842 表达量,结果显示 RCC 组织中的 hsa_circ_001842 表达量增高 ($t=20.665, P=0.000$) (图 1B)。qRT-PCR 检测 hsa_circ_001842 在人正常肾上皮细胞株 HK-2 及 Caki-1、769-P、OSRC-2 和 ACHN 4 种人肾癌细胞株中的表达量,结果表明 Caki-1 ($t=-13.487, P=0.000$)、769-P ($t=-6.903, P=0.002$)、OSRC-2 ($t=-8.605, P=0.001$) 和 ACHN ($t=-11.111, P=0.000$) 中 hsa_circ_001842 的表达量都明显高于 HK-2 (图 1C)。



A. 差异 circ RNA 表达热图



B. 样本中 hsa_circ_001842 表达量

C. 各细胞系中 hsa_circ_001842 表达量

注:a,与 NC 组相比, $P<0.05$

图 1 hsa_circ_001842 在 RCC 组织及肾癌细胞中的表达

2.2 高表达 hsa_circ_001842 RCC 患者生存率降低

将 64 例 RCC 样本根据 hsa_circ_001842 表达水平分为高表达组 (32 例) 与低表达组 (32 例)。经 Kaplan-Meier 法计算 RCC 患者的生存率发现,hsa_circ_001842 高表达组患者的存活率明显低于低表达组 ($\chi^2=7.683, P=0.006$),提示 hsa_circ_001842 高表达的 RCC 患者与其不良生存率有关 (图 2)。

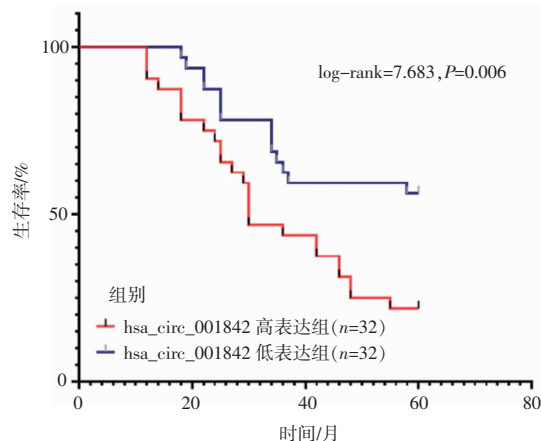
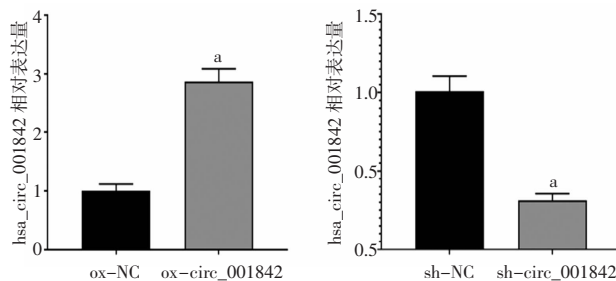


图 2 高表达 hsa_circ_001842 RCC 患者生存率

2.3 hsa_circ_001842 在体外可增强 Caki-1 肾癌细胞增殖、迁移和侵袭的能力

qRT-PCR 结果表明,转染 ox-circ_001842 质粒后,hsa_circ_001842 的表达量明显增高 ($t=13.273, P=0.000$) (图 3A),转染 sh-circ_001842 质粒后,hsa_circ_001842 的表达量明显降低 ($t=11.468, P=0.000$) (图 3B)。与 ox-NC 组相比,ox-circ_001842 组的 Caki-1 肾癌细胞的增殖能力增强 ($t=5.383, P=0.006$) (图 4A、B),细胞凋亡水平降低 ($t=11.115, P=0.000$) (图 5A、B),细胞的迁移 ($t=-3.964, P=0.017$) (图 6A、B) 和侵袭 ($t=-7.849, P=0.001$) (图 7A、B) 能力增强。与 sh-NC 组相比,sh-circ_001842 组的 Caki-1 肾癌细胞的增殖能力降低 ($t=8.580, P=0.001$) (图 4A、C),细胞凋亡水平升高 ($t=-12.030, P=0.000$) (图 5A、C),同时细胞的迁移 ($t=9.116, P=0.001$) (图 6A、C) 和侵袭 ($t=10.601, P=0.000$) (图 7A、C) 能力受抑制。

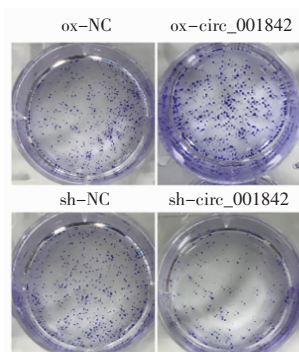


A. 过表达 hsa_circ_001842 组

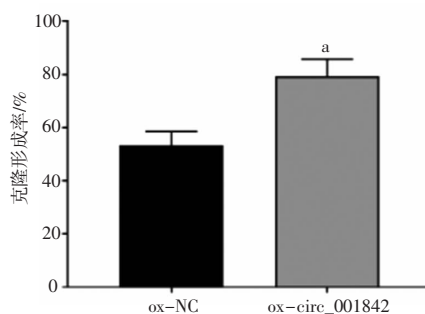
B. 沉默 hsa_circ_001842 组

注:a,与 NC 组相比, $P<0.05$

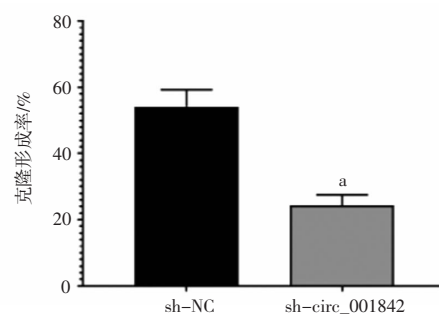
图 3 转染不同质粒的 Caki-1 肾癌细胞的 hsa_circ_001842 表达水平变化



A. 细胞克隆形成实验



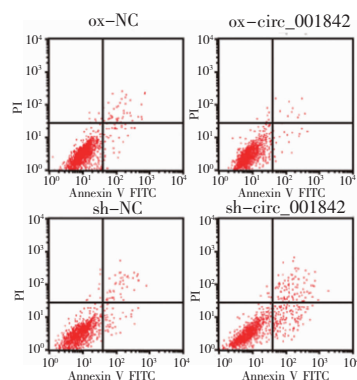
B. 过表达 hsa_circ_001842 组



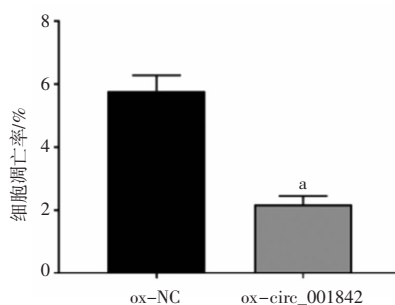
C. 沉默 hsa_circ_001842 组

注:a,与 NC 组相比, $P<0.05$

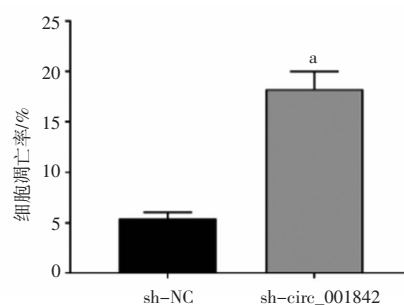
图 4 转染不同质粒的 Caki-1 肾癌细胞的增殖能力变化



A. 细胞克隆形成实验



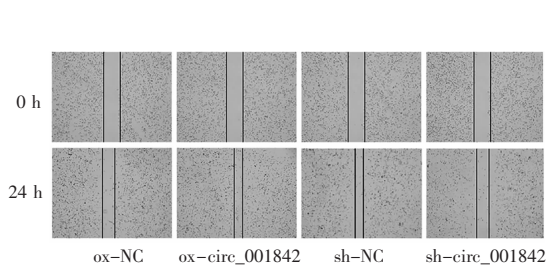
B. 过表达 hsa_circ_001842 组



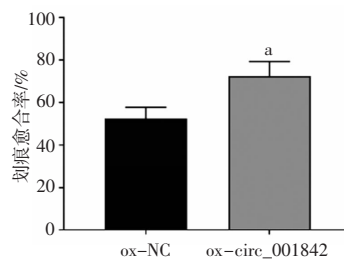
C. 沉默 hsa_circ_001842 组

注:a,与 NC 组相比, $P<0.05$

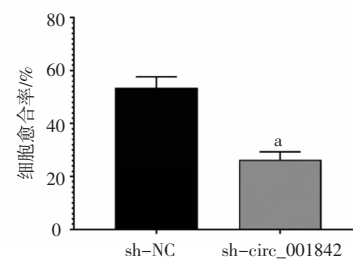
图 5 转染不同质粒的 Caki-1 肾癌细胞的凋亡能力变化



A. 细胞划痕实验



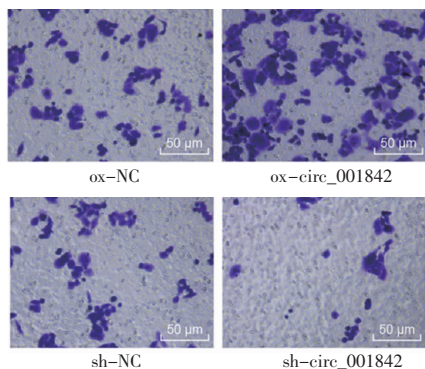
B. 过表达 hsa_circ_001842 组



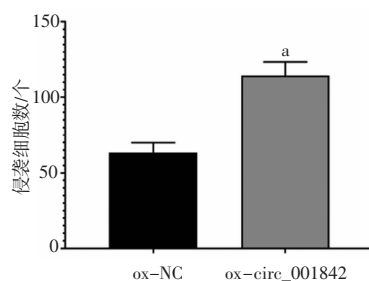
C. 沉默 hsa_circ_001842 组

注:a,与 NC 组相比, $P<0.05$

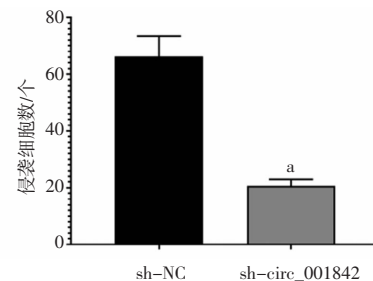
图 6 转染不同质粒的 Caki-1 肾癌细胞的迁移能力变化



A. 细胞侵袭实验



B. 过表达 hsa_circ_001842 组



C. 沉默 hsa_circ_001842 组

注:a,与 NC 组相比, $P<0.05$

图 7 转染不同质粒的 Caki-1 肾癌细胞的侵袭能力变化

2.4 hsa_circ_001842 可影响 Caki-1 肾癌细胞上皮-间质转化过程

使用 Western blot 检测 Caki-1 肾癌细胞中过表达或沉默 hsa_circ_001842 后 E-cadherin、N-cadherin 和 MMP-9 蛋白的表达水平,结果显示与 ox-NC 组相比,ox-circ_001842 组的 E-cadherin 表达降低($t=14.037, P=0.000$), N-cadherin ($t=-7.268, P=0.002$)和 MMP-9($t=-6.320, P=0.003$)表达增加(图 8A、B)。与 sh-NC 组相比,sh-circ_001842 组的 E-cadherin 表达增多($t=-8.045, P=0.001$), N-cadherin($t=10.545, P=0.000$)和 MMP-9($t=11.815, P=0.000$)表达减少(图 8A、C)。

2.5 抑制 hsa_circ_001842 的表达可抑制 RCC 的发展

与 sh-NC 组相比,sh-circ_001842 组裸鼠形成的肿瘤体

积(7 d: $t=4.247, P=0.000$; 14 d: $t=17.898, P=0.000$; 21 d: $t=15.432, P=0.000$; 28 d: $t=19.241, P=0.000$)和体重($t=15.153, P=0.000$)均小于 sh-NC 组的肿瘤(图 9A~C)。qRT-PCR 和免疫组化结果显示,与 sh-NC 组相比,sh-circ_001842 组肿瘤中 E-cadherin 的 mRNA($t=-16.135, P=0.000$)和蛋白质($t=-4.920, P=0.000$)表达水平明显上升, N-cadherin 的 mRNA($t=26.215, P=0.000$)的蛋白质($t=20.633, P=0.000$)表达水平明显下降(图 9D、E)。以上实验结果表明,抑制 circ_001842 表达后能降低 Caki-1 肾癌细胞的上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)水平和成瘤能力。

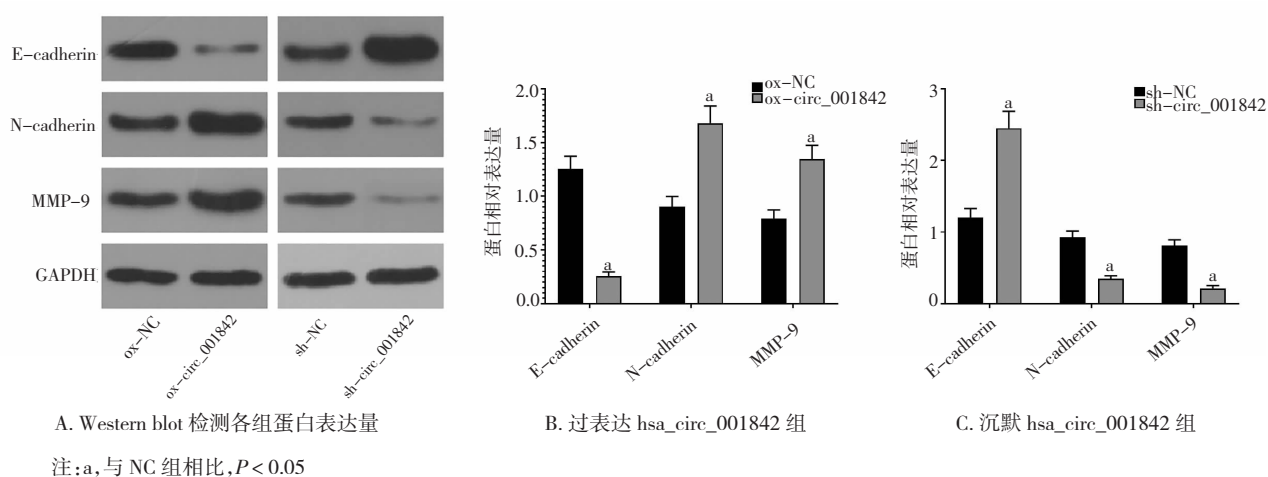


图 8 E-cadherin、N-cadherin 和 MMP-9 蛋白表达情况

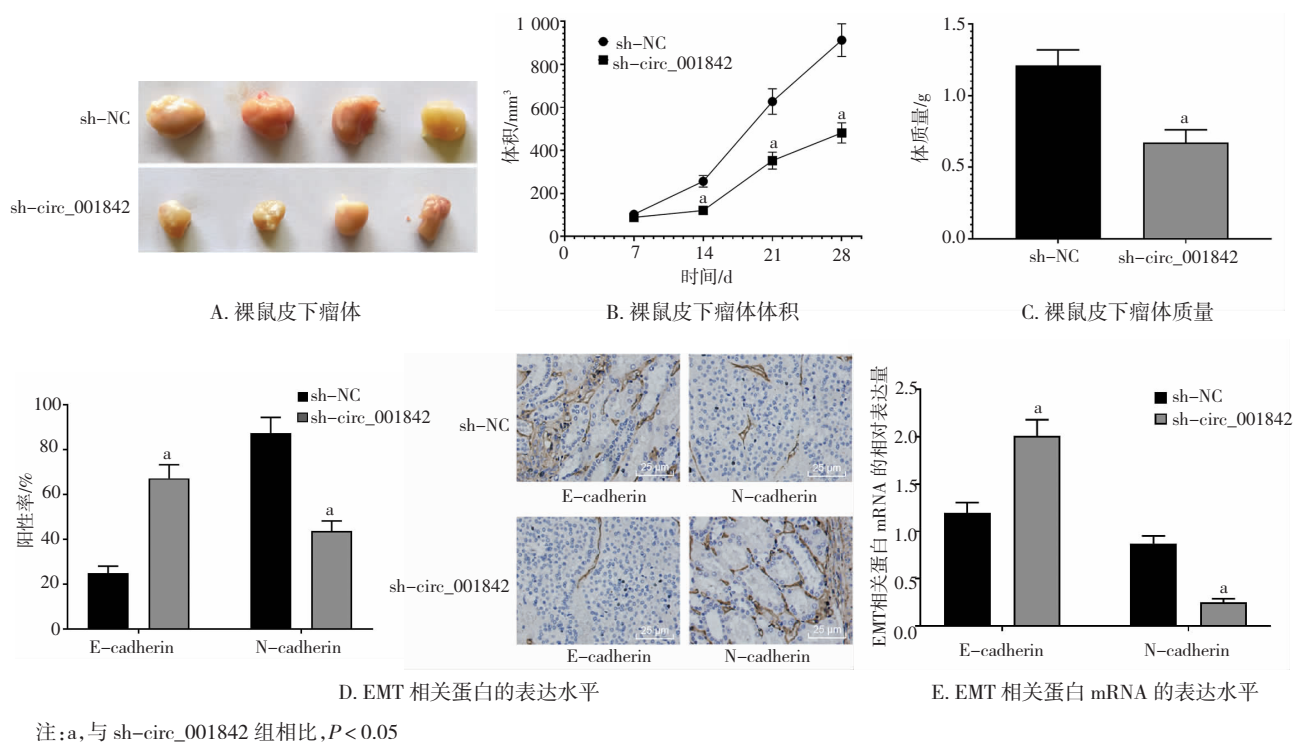


图 9 抑制 hsa_circ_001842 的表达可抑制 RCC 的发展

3 讨论

RCC 是一种起源于肾上皮细胞的最常见的肾癌形式,在肾脏肿瘤中占比约 90%^[13]。据统计,在 2018 至 2020 年主要的新增癌症病例排名中,发现肾癌在男性中持续排名第六,而在女性中的排名从第十上升至第八^[1,14-15]。RCC 发病率在全球呈逐年上升趋势,其原因可能是多方面的。首先,尽管对该病早期诊断的技术有极大提高,但只有约 10% 的 RCC 患者有特征性的临床症状表现^[16]。因此,漏诊尚不能完全避免;其次,有充分的证据表明肥胖和高血压会增加患肾癌的风险^[17]。随着人们生活水平的升高,肥胖和高血压的患病率不断升高,可进一步增加肾癌的患病风险。正是由于 RCC 缺乏早期特异性临床症状,导致该病的诊断常常被延迟,甚至漏诊。因此,若能进一步明确 RCC 发生发展的分子机制,对寻找 RCC 早期诊断与治疗的方法很有意义。Circ RNA 已被证明是人类多种癌症的关键调节因子,但 hsa_circ_001842 与 RCC 的研究还未有报道。本研究揭示了 hsa_circ_001842 在肾癌发生发展过程中所起的作用,发现 hsa_circ_001842 在肾癌组织中高表达,抑制 hsa_circ_001842 的表达可能有助于减少肾肿瘤的发生。

本研究发现,RCC 组织中 hsa_circ_001842 表达量明显升高。荧光定量 PCR 检测结果显示,RCC 患者 RCC 组织和 4 种人肾癌细胞株(Caki-1、769-P、OSRC-2 和 ACHN)的 hsa_circ_001842 表达量均明显高于正常组织和人正常肾上皮细胞株 HK-2 的 hsa_circ_001842 表达量。可见,RCC 患者存在 hsa_circ_001842 表达上调现象。分析 RCC 患者的生存率可以发现,hsa_circ_001842 高表达组的生存率低于 hsa_circ_001842 低表达组,提示 hsa_circ_001842 的高表达可能与患者不良生存率有关。此外,通过细胞转染、细胞划痕、细胞侵袭实验和细胞凋亡检测等一系列实验,发现干扰 hsa_circ_001842 基因的表达可以抑制 Caki-1 细胞增殖、迁移和侵袭的能力,促进细胞凋亡;而 hsa_circ_001842 基因的过表达可促进 Caki-1 细胞增殖、迁移和侵袭,抑制细胞凋亡。这与 Zhou B 等^[18]发现 1 种新型 circ RNA circ

PCNXL2 的过表达可以促进 RCC 细胞的增殖和侵袭的研究结果相似。综上所述,hsa_circ_001842 在 RCC 组织和商品 RCC 细胞株中呈高表达,hsa_circ_001842 对肿瘤细胞的生长发育有促进作用,提示其对 RCC 的发生发展可能具有调控作用。

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)家族是降解细胞外基质的重要肽链内切酶类,是与癌症发展、促进血管生成、侵袭、转移和逃避免疫监视有关的基因^[19]。有研究称,MMP-9 具有作为非小细胞肺癌、宫颈癌、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌等肿瘤标志物的潜力^[20]。此外,Kallakury BV 等^[21]研究发现,与无远处转移的 RCC 患者相比,在发生转移的 RCC 患者中 MMP-9 表达升高。EMT 已经被证明在肿瘤的发生发展中起至关重要的作用,EMT 的标志是 E-cadherin 的上调,然后 N-cadherin 的下调。有研究发现,E-cadherin 在肾透明细胞癌组织中呈低表达,且与肿瘤远处转移及肾透明细胞癌预后不良有关^[22]。Shimazui T 等^[23]研究指出,N-cadherin 可能与 RCC 的侵袭性有关。可见,E-cadherin、N-cadherin 和 MMP 与肿瘤细胞的侵袭和转移存在一定相关性。本研究使用 Western blot 检测了过表达 hsa_circ_001842 与沉默 hsa_circ_001842 的 Caki-1 肾癌细胞中 E-cadherin、N-cadherin 和 MMP-9 的表达水平,结果显示过表达 hsa_circ_001842 的 Caki-1 肾癌细胞 E-cadherin 表达明显减少,而 N-cadherin 和 MMP-9 表达明显增多,说明 hsa_circ_001842 在体外可促进 Caki-1 肾癌细胞 EMT 过程,对 RCC 的恶化具有促进作用,同时也再一次印证 hsa_circ_001842 基因可增强 Caki-1 肾癌细胞迁移、侵袭能力。此外,裸鼠成瘤实验表明,抑制 hsa_circ_001842 的表达可以抑制肾癌细胞的 EMT 相关蛋白水平及其成瘤的能力。因此,笔者推测 hsa_circ_001842 作为一种致癌基因,可能在 RCC 中高表达,通过促进 N-cadherin 与 MMP-9 的表达,同时抑制 E-cadherin 的表达参与 RCC 的发生、侵袭与转移。

综上所述,本研究证实 hsa_circ_001842 在 RCC 组织和细胞中表达上调,抑制 hsa_circ_001842 的表达能抑制 RCC 细胞的增殖、侵袭和成瘤能力,促进细胞凋亡。其作用机制可能与下调 E-cadherin 表

达,上调 N-cadherin、MMP-9 表达水平有关。但它通过何种信号通路调控 EMT 相关蛋白的表达、参与 RCC 发生发展的特异性分子机制还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020[J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(1): 7-30.
- [2] Capitanio U, Bensalah K, Bex A, et al. Epidemiology of renal cell carcinoma[J]. Eur Urol, 2019, 75(1): 74-84.
- [3] Barata PC, Rini BI. Treatment of renal cell carcinoma: current status and future directions[J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(6): 507-524.
- [4] Zabor EC, Furberg H, Lee B, et al. Long-term renal functional recovery following radical nephrectomy for kidney cancer: results from a multicenter confirmatory study[J]. J Urol, 2018, 199(4): 921-926.
- [5] Zhao J, Li L, Wang Q, et al. CircRNA expression profile in early-stage lung adenocarcinoma patients[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 44(6): 2138-2146.
- [6] Tian M, Chen R, Li T, et al. Reduced expression of circRNA hsa_circ_0003159 in gastric cancer and its clinical significance[J]. J Clin Lab Anal, 2018, 32(3): e22281.
- [7] Li P, Yang X, Yuan W, et al. CircRNA-Cdr1as exerts anti-oncogenic functions in bladder cancer by sponging microRNA-135a[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 46(4): 1606-1616.
- [8] Wang H, Xiao Y, Wu L, et al. Comprehensive circular RNA profiling reveals the regulatory role of the circRNA-000911/miR-449a pathway in breast carcinogenesis[J]. Int J Oncol, 2018, 52(3): 743-754.
- [9] Jin C, Shi L, Li Z, et al. Circ_0039569 promotes renal cell carcinoma growth and metastasis by regulating miR-34a-5p/CCL22[J]. Am J Transl Res, 2019, 11(8): 4935-4945.
- [10] Wang G, Xue W, Jian W, et al. The effect of Hsa_circ_0001451 in clear cell renal cell carcinoma cells and its relationship with clinicopathological features[J]. J Cancer, 2018, 9(18): 3269-3277.
- [11] 邹爽, 徐忠伟, 张妍. 胶质瘤细胞 U87 中 JMJD3 表达对上皮细胞间质转化及细胞迁移的影响[J]. 武警后勤学院学报, 2017, 26(9): 737-741.
- [12] Wang N, Jiang R, Yang JY, et al. Expression of TGF- β 1, SNAI1 and MMP-9 is associated with lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma[J]. J Mol Histol, 2014, 45(4): 391-399.
- [13] Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S, et al. Renal cell carcinoma[J]. Nat Rev Dis Primers, 2017, 3: 17009.
- [14] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1): 7-30.
- [15] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34.
- [16] Petejova N, Martinek A. Renal cell carcinoma: Review of etiology, pathophysiology and risk factors[J]. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2016, 160(2): 183-194.
- [17] Chiong E, Giles RH, Jewett MA, et al. The global burden of kidney cancer: a call to action[J/OL]. (2017-05) [2020-02-17]. <https://worldkidneycancerday.org/wp-content/uploads/2017/05/IKCC-Global-Burden-of-Kidney-Cancer-full-paper.pdf>.
- [18] Zhou B, Zheng P, Li Z, et al. CircPCNXL2 Sponges miR-153 to promote the proliferation and invasion of renal cancer cells through up-regulating ZEB2[J]. Cell Cycle, 2018, 17(23): 2644-2654.
- [19] Gobin E, Bagwell K, Wagner J, et al. A pan-cancer perspective of matrix metalloproteases (MMP) gene expression profile and their diagnostic/prognostic potential[J]. BMC Cancer, 2019, 19(1): 581.
- [20] Huang H. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as a cancer biomarker and MMP-9 biosensors: recent advances[J]. Sensors (Basel), 2018, 18(10): E3249.
- [21] Kallakury BV, Karikhalli S, Haholu A, et al. Increased expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 correlate with poor prognostic variables in renal cell carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(10): 3113-3119.
- [22] Ye M, Fan G, Zhu S, et al. Low expressions of EHD2 and E-cadherin correlate with a poor prognosis for clear cell renal cell carcinoma[J]. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2019, 44(8): 864-870.
- [23] Shimazui T, Kojima T, Onozawa M, et al. Expression profile of N-cadherin differs from other classical cadherins as a prognostic marker in renal cell carcinoma[J]. Oncol Rep, 2006, 15(5): 1181-1184.

(责任编辑: 唐秋姗)