

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.11.009

· 临床研究 ·

miR-125a-5p 通过靶向 STAT3 抑制肾癌细胞增殖和侵袭及其可能机制

杨明¹, 姜泰茂², 刘兴凯², 杨志伟² (1. 锦州医科大学 北部战区空军医院 研究生培养基地, 辽宁 锦州 121001; 2. 北部战区空军医院 泌尿外科, 辽宁 沈阳 110042)

[摘要] **目的:** 探究 miR-125a-5p 靶向 STAT3 对肾癌细胞增殖和侵袭的影响, 并初步分析其作用机制。 **方法:** 选取 2017 年 3 月至 2018 年 2 月于北部战区空军医院泌尿外科接受肾癌手术治疗的癌组织及配对的癌旁组织灶边缘(距癌缘>3 cm)标本各 48 例, 体外培养正常肾细胞 HK-2、和肾癌细胞 A498、GRC-1、786-O 及 ACHN, 采用 qPCR 检测组织和细胞中 miR-125a-5p 的表达。分别将 miR-125a-5p-NC、miR-125a-5p-mimics、pLV-STAT3 及 pLV-STAT3+miR-125a-5p mimics 转染 A498 细胞作为 NC 组(阴性对照组)、miR-125a-5p-mimics 组、pLV-STAT3 组及 pLV-STAT3+mimics 组, 另外以正常培养 A498 细胞作为空白对照组(Control, Ctrl), 采用 qPCR 检测各组细胞中 miR-125a-5p、信号转导和转录激活因子 3(STAT3)mRNA 的表达。应用生物信息学预测软件和双荧光素酶法分析 miR-125a-5p 与 STAT3 的靶向关系; 采用 CCK-8 检测各组细胞增殖活性, 流式细胞术检测细胞凋亡, Transwell 小室法检测细胞侵袭能力; WB 检测细胞中 STAT3、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 蛋白(Bcl-2)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 相关 X 蛋白(BAX)、活化半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-3 蛋白(caspase-3)、抑癌基因 p21、神经钙黏素(N-cadherin)、钙黏蛋白(E-cadherin)、血管内皮生长因子(VEGF)及缺氧诱导因子-1(HIF-1)的表达。 **结果:** miR-125a-5p 在肾癌组织和细胞中表达显著低于癌旁组织和正常肾细胞(均 $P<0.05$); 相较于 NC 组, 转染 miR-125a-5p-mimics 后 A498 细胞中 miR-125a-5p 的表达显著上升、STAT3 mRNA 的表达显著下降(均 $P<0.01$)。实验证实 STAT3 为 miR-125a-5p 的靶基因。与 NC 组相比, miR-125a-5p mimics 组细胞增殖活性、侵袭细胞数及 Bcl-2、N-cadherin、VEGF、HIF-1、STAT3 及其磷酸化水平均显著下降(均 $P<0.05$), 凋亡率及 BAX、p21、caspase-3 及 E-cadherin 表达显著上升(均 $P<0.05$); pLV-STAT3 组细胞增殖活性、侵袭细胞数及 Bcl-2、N-cadherin、VEGF、HIF-1、STAT3 及其磷酸化水平显著上升(均 $P<0.05$), 凋亡率及 BAX、p21、caspase-3、E-cadherin 表达显著下降(均 $P<0.05$)。与 pLV-STAT3 组相比, pLV-STAT3 mimics 组细胞增殖活性、侵袭细胞数、Bcl-2、N-cadherin、VEGF、HIF-1、STAT3 及其磷酸化水平显著下降(均 $P<0.05$), 凋亡率、BAX、p21、caspase-3 及 E-cadherin 表达显著上升(均 $P<0.05$)。 **结论:** miR-125a-5p 在肾癌组织和细胞中呈低表达, 可通过下调其靶基因 STAT3 抑制 A498 细胞的增殖和侵袭, 并促进其凋亡。

[关键词] miR-125a-5p; 信号转导和转录激活因子 3; 肾癌; A498 细胞; 增殖; 侵袭

[中图分类号] R737.11; R730.59 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)11-1235-08

Inhibition of proliferation and invasion of renal cancer cells by miR-125a-5p targeting STAT3 and its possible mechanism

YANG Ming¹, JIANG Taimao², LIU Xingkai², YANG Zhiwei² (1. Postgraduate Training Base of Air Force Hospital of Northern War Zone, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning, China; 2. Department of Urology, the Air Force Hospital of the Northern War Zone, Shenyang 110042, Liaoning, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of miR-125a-5p targeting signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) on proliferation and invasion of renal cancer cells, and to preliminarily analyze the action mechanism. **Methods:** During the period from March 2017 to February 2018, 48 pairs of cancer tissues and corresponding normal adjacent tissues (more than 3 cm away from the tumor margin) resected from patients underwent renal cancer surgery at the Department of Urology, the Air Force Hospital of the Northern War Zone were collected for this study. Normal renal HK-2 cells and renal cancer cells (A498, GRC-1, 786-O and ACHN) were cultured *in vitro*. The expression of miR-125a-5p in above mentioned tissues and cells was detected by qPCR. miR-125a-5p-NC, miR-125a-5p-mimics, pLV-STAT3 and pLV-STAT3 with miR-125a-5p mimics were transfected into A498 cells, namely NC group (negative control group), miR-125a-5p-mimics group, pLV-STAT3 group and pLV-STAT3+mimics group. The normally cultured A498 cells

[基金项目] 辽宁省科学技术计划资助项目(No. 20170540922)。Project supported by Science and Technology Plan of Liaoning Province (No. 20170540922)

[作者简介] 杨明(1986-), 男, 本科, 住院医师, 主要从事泌尿系统疾病的基础与临床研究, E-mail: ymmy369@163.com

[通信作者] 姜泰茂(JIANG Taimao, corresponding author), 博士, 副主任医师, 研究生导师, 主要从事泌尿外科肾移植相关的研究, E-mail: jtmiao123@163.com

were used as blank control (Ctrl group). qPCR was performed to detect them RNA expressions of miR-125a-5p and STAT3 in cells of all groups. The bioinformatics prediction software and Dual luciferase assay were performed to analyze the targeting relationship between miR-125a-5p and STAT3. CCK-8, Flow cytometry, Transwell chamber assay were performed to detect cell proliferation activity, apoptosis and invasion, respectively. The expressions of STAT3, Bcl-2, BAX, cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase 3 (cl-caspase-3), tumor suppressor gene p21, N-cadherin, E-cadherin, VEGF and HIF-1 in the cells were detected by WB. **Results:** The expression of miR-125a-5p in renal cancer tissues and cells was significantly lower than that in adjacent normal tissues and normal renal cells (all $P < 0.05$). Compared with NC group, expression of miR-125a-5p in A498 cells transfected with miR-125a-5p-mimics was significantly increased, while expression of STAT3 mRNA was significantly decreased (all $P < 0.05$). STAT3 was the target gene of miR-125a-5p. Compared with NC group, cell viability, number of invasive cells, expressions of Bcl-2, N-cadherin, VEGF, HIF-1, and STAT3 as well as its phosphorylation level in miR-125a-5p mimics group were significantly decreased (all $P < 0.05$), while cell apoptosis and expressions of BAX, p21, cl-caspase-3 and E-cadherin were significantly increased (all $P < 0.05$); the cell viability, number of invasive cells, expressions of Bcl-2, N-cadherin, VEGF, HIF-1 and STAT3 as well as its phosphorylation level in pLV-STAT3 group were significantly increased (all $P < 0.05$), while cell apoptosis and expressions of BAX, p21, cl-caspase-3 and E-cadherin were significantly decreased (all $P < 0.05$). Compared with pLV-STAT3 group, cell viability, number of invasive cells, expressions of Bcl-2, N-cadherin, VEGF, HIF-1, and STAT3 as well as its phosphorylation level were significantly decreased in pLV-STAT3 mimics group (all $P < 0.05$), while cell apoptosis, expressions of BAX, p21, cl-caspase-3 and E-cadherin were significantly increased (all $P < 0.05$). **Conclusion:** miR-125a-5p shows low expression in renal cancer tissues and cells, which can inhibit proliferation and invasion of A498 cells and promote cell apoptosis by down-regulating its target gene STAT3.

[Key words] miR-125a-5p; signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3); renal cancer; A498 cell; proliferation; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(11): 1235-1242. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.11.009]

肾癌是泌尿系统常见的恶性肿瘤之一,我国流行病学统计显示,其发病率和病死率逐年递增;目前,肾癌的主要治疗方式仍停留在手术阶段^[1-3]。由于肾癌早期临床症状不明显,往往已进入中晚期才确诊,大大降低了患者治疗有效率及术后生存时间;此外,肾癌对放化疗不敏感,20%~30%的患者手术切除后会出现复发及转移,预后较差^[4-5]。随着基因肿瘤学的发展,研究发现micro RNA(miRNA)与多种肿瘤的发生发展密切相关^[6-7]。据报道^[8-9],miR-125a-5p在乳腺癌、肺癌组织中低表达,并抑制乳腺癌细胞、肺癌细胞的增殖。但miR-125a-5p与肾癌的相关研究较少,故本研究拟探讨miR-125a-5p对肾癌细胞增殖和侵袭的影响及其可能作用机制。

1 资料与方法

1.1 患者资料

癌及配对的癌旁组织样本来自2017年3月至2018年2月于北部战区空军医院泌尿外科接受手术治疗的48例肾癌患者,其癌旁组织取自距癌灶边缘>3 cm。患者47~73岁,平均年龄(61.32±9.85)岁;男性35例、女性13例。纳入标准:患者术后病理检查确诊为肾癌;年龄>18岁。排除标准:合并其他恶性肿瘤;伴有心、肝、肾等重要器官功能障碍;自身免疫性疾病;凝血功能障碍;具有其他影响miR-125a-5p水平因素的患者。本研究已通过医院伦理委员会审核,所有患者在研究开始前均签署知情同意书。正常肾细胞株HK-2,肾癌细胞株A498、GRC-1、786-O、

ACHN均由中国科学院生物化学与细胞学研究所提供,常规培养,冻存于本实验室液氮罐。

1.2 主要试剂与仪器

荧光染料SYBR Green I购自美国Invitrogen公司,胎牛血清、DMEM培养基、Transwell小室购自美国Gibco公司,引物序列、表达载体及慢病毒包装质粒由上海吉玛生物有限公司提供,B细胞淋巴瘤/白血病-2蛋白(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、B细胞淋巴瘤/白血病-2相关X蛋白(Bcl-2 associated X, BAX)、活化半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-3蛋白(cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase 3, cl-caspase-3)蛋白一抗购自美国Abcam公司。紫外分光光度计购自美国Thermo公司,qPCR仪购自美国Applied Biosystems公司,流式细胞仪购自美国贝克曼库尔特公司。

1.3 qPCR检测肾癌组织和细胞中miR-125a-5p、STAT3 mRNA的表达

采用TRIzol法提取组织标本或细胞中总RNA,经紫外分光光度计定量,并计算 D_{260}/D_{280} 分析其纯度;将提取的RNA逆转录为cDNA,混入荧光染料SYBR Green I进行qPCR,反应条件为94℃预变性5 min、94℃变性30 s、55℃退火30 s、72℃延伸60 s,共30个循环,最后72℃下扩展10 min采集荧光信号;每个样本做3次重复,以U6为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算miR-125a-5p、信号转导和转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription-3, STAT3) mRNA的相对表达量,其引物序列见表1。

表1 基因U6, miR-125a-5p和STAT3的引物序列
Tab.1 Primer sequences of gene U6, miR-125a-5p and STAT3

Gene	Primer sequence
U6	Upstream: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACACA-3'
	Downstream: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'
miR-125a-5p	Upstream: 5'-TCCCTGAGACCCTTTAAACTGTGA-3'
	Downstream: 5'-TGGTGTCTGGAGTTCG-3'
STAT3	Upstream: 5'-CGGGATCCATGGCCCAATGGAATCAGCT-3'
	Downstream: 5'-CCCTCGAGCATGGGGGAGGTAGCGCACT-3'

1.4 细胞转染与分组

取适量A498细胞接种于6孔板,分别将miR-125a-5p-NC、miR-125a-5p-mimics、pLV-STAT3及pLV-STAT3+miR-125a-5p mimics转染A498细胞作为NC组(阴性对照组)、miR-125a-5p-mimics组、pLV-STAT3组及pLV-STAT3+mimics组。具体操作参照转染试剂盒说明书步骤进行,另正常培养A498细胞为空白对照组(Control)。

1.5 生物信息学预测和双荧光素酶法分析miR-125a-5p与STAT3的靶向关系

应用生物信息学预测软件TargetScan3.1、Mirbase和miRanda等筛选出miR-125a-5p的靶基因STAT3,应用双荧光素酶法进一步分析其靶向关系;根据预测软件提示的潜在结合位点信息,合成含该位点的DNA片段(Wt)以及含该位点突变体的DNA片段(Mut),并克隆到双荧光素酶启动子载体上;将该质粒和miR-125a-5p mimics共转染细胞A498,置于37℃、5%CO₂恒温培养箱中培养48h,检测各组细胞荧光素酶活性。

1.6 CCK-8检测过表达miR-125a-5p对A498细胞增殖的影响

将转染后细胞接种至96孔板,分别培养24、48和72h,隔天更换一次培养基,并观察细胞生长状态;每孔加入10μl CCK-8溶液,继续培养4h,用酶标仪检测各孔在450nm处的光密度(D)值。

1.7 流式细胞术检测过表达miR-125a-5p对A498细胞凋亡的影响

收集适量转染后细胞,750×g离心5min,混入孵育缓冲液(10mmol/L HEPES/NaOH+140mmol/L NaCl+5mmol/L CaCl₂)后再次离心5min;加入100μl FITC-Annexin V和PI染液重悬细胞,避光条件下室温孵育5min;混入孵育缓冲液,750×g离心5min;加入荧光SA-FLOUS溶液,避光条件下4℃孵育20min。上流式细胞仪检测,激发光波长488nm,用波长515nm的滤器检测FITC荧光,波长大于560nm的滤器检测PI荧光。在双变量流式细胞仪的散点图

上,左下象限显示活细胞,为FITC⁻/PI⁻;右上象限是晚期凋亡细胞,为FITC⁺/PI⁺;右下象限是早期凋亡细胞,为FITC⁺/PI⁻。细胞凋亡率为早期凋亡率与晚期凋亡率之和。

1.8 Transwell小室法检测过表达miR-125a-5p对A498细胞侵袭能力的影响

现配Matrigel基质胶铺于Transwell小室内室,置于37℃烘箱中干燥2h。将转染后细胞按适宜密度接种至上述Transwell小室的内室,并加入500μl含20%胎牛血清的DMEM培养基于Transwell的下室,置于37℃、5%CO₂恒温培养箱中无菌培养48h;取出Transwell小室并轻轻拭去上室底部的基质胶及未侵袭细胞,固定于多聚甲醛中30min,DAPI染色染色30min,荧光显微镜下挑选5个视野拍照、计数。

1.9 WB检测过表达miR-125a-5p对A498细胞中相关蛋白的表达的影响

收集转染后细胞采用RIPA法冰上裂解1h,4℃下12000×g离心30min;取上清分装后,经BCA法检测总蛋白浓度;取70μg蛋白行聚丙烯酰胺凝胶电泳,当蓝色染料到达凝胶底部时,终止电泳;将蛋白电转至PVDF膜;将膜取出浸泡于甲醇中固定3min,浸于5%脱脂牛奶中轻轻震荡孵育1.5h;滴加相应一抗,4℃孵育过夜;滴加二抗,室温下孵育40min;滴加化学发光液,于暗室曝光显影。利用ImageJ软件进行灰度分析,以GADPH的表达为内参,计算目的蛋白的相对表达量(目的蛋白的灰度值/GADPH的灰度值)。

1.10 统计学处理

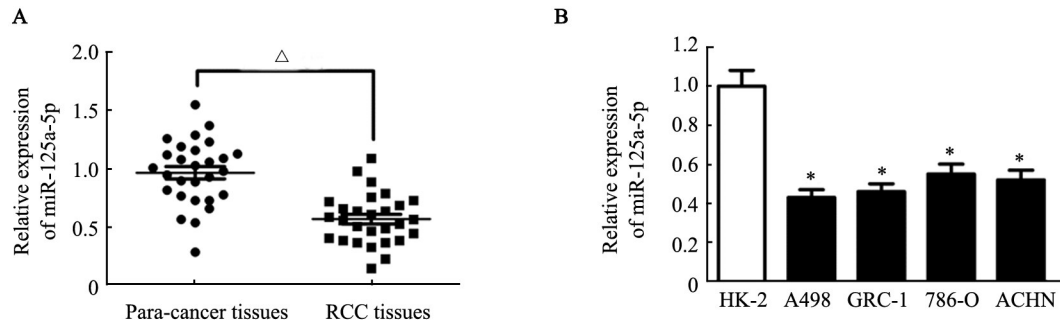
采用SPSS17.0软件进行统计学分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用LSD法,以P<0.05或P<0.01表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-125a-5p在肾癌组织和细胞中呈低表达

qPCR检测结果(图1)显示,miR-125a-5p在肾癌组织中的表达显著低于癌旁组织(P<0.05);miR-

125a-5p在肾癌细胞 A498、GRC-1、786-O 和 ACHN 中的表达显著低于正常肾细胞 HK-2(均 $P < 0.05$)。



$\Delta P < 0.05$ vs Para-cancer tissues; * $P < 0.05$ vs HK-2 cell

A: Expression of miR-125a-5p in renal cancer tissues and its para-cancerous tissues;

B: Expression of miR-125a-5p in normal renal cells and renal cancer cells

图1 miR-125a-5p 在不同肾组织和细胞中的表达

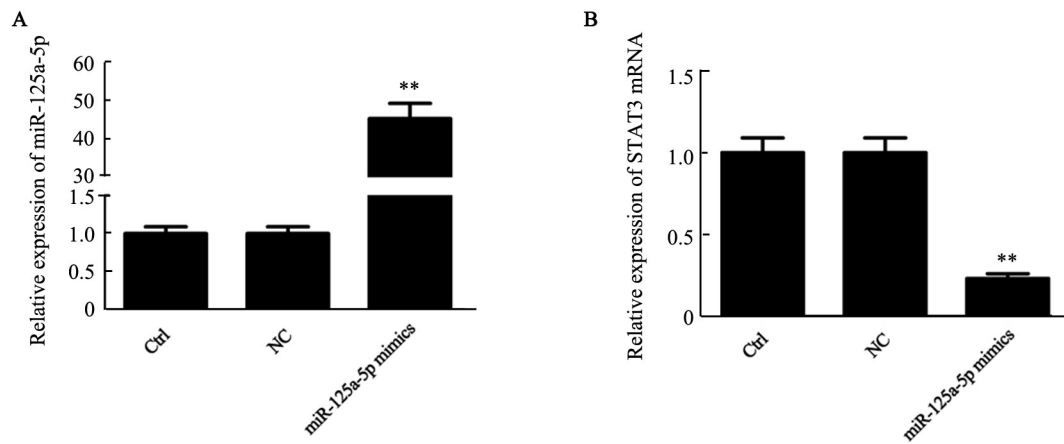
Fig.1 Expression of miR-125a-5p in different renal tissues and cells

2.2 转染 miR-125a-5p mimics 影响 A498 细胞中 miR-125a-5p、STAT3 mRNA 的表达

qPCR 检测结果(图2)显示,转染 miR-125a-5p mimics 后,相较于 NC 组, A498 细胞中 miR-125a-5p 的表达显著上升, STAT3 mRNA 的表达显著下降(均 $P < 0.01$); 而 NC 组与 Control 组中 miR-125a-5p、STAT3 mRNA 的表达无显著差异($P > 0.05$)。

2.3 miR-125a-5p 和 STAT3 的靶向关系

双荧光素酶实验检测结果(图3)显示,共转染野生型荧光素酶质粒和 miR-125a-5p mimics 组荧光素酶活性显著降低($P < 0.05$),验证了 miR-125a-5p 和 STAT3 的靶向关系;与 NC 组相比, miR-125a-5p mimics 组 STAT3 蛋白及其磷酸化水平显著下降, pLV-STAT3 组 STAT3 及其磷酸化水平显著上升(均 $P < 0.05$);与 pLV-STAT3 组相比, pLV-STAT3 mimics 组 STAT3 及其磷酸化水平显著下降(均 $P < 0.05$)。



** $P < 0.05$ vs NC group

A: Effect of miR-125a-5p over-expression on expression of miR-125a-5p in A498 cells;

B: Effect of miR-125a-5p over-expression on expression of STAT3 mRNA in A498 cells

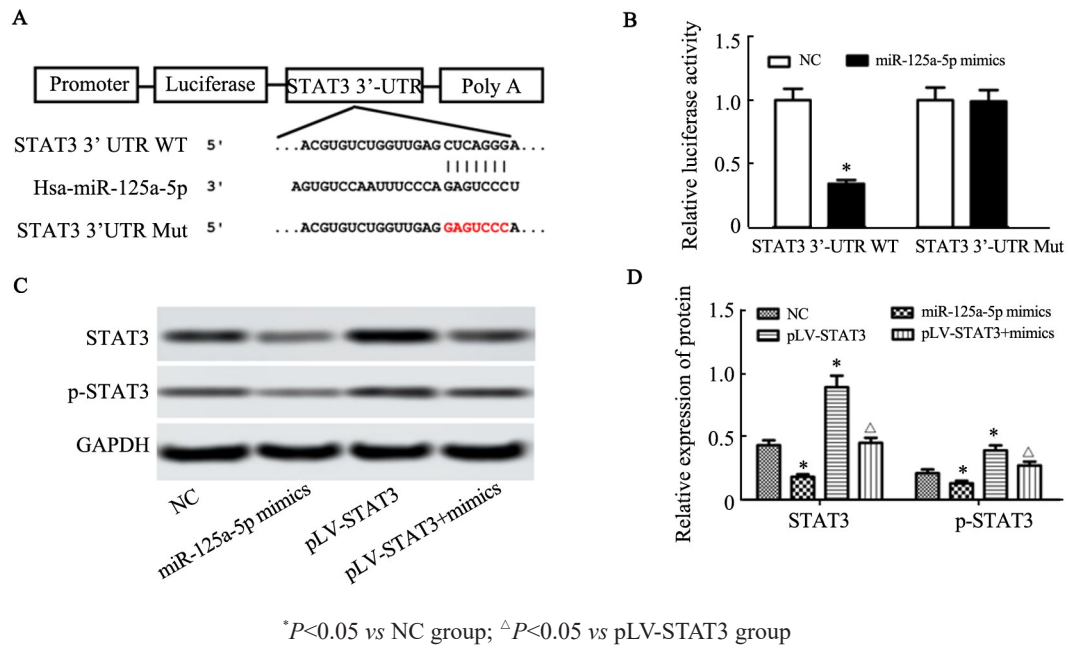
图2 过表达 miR-125a-5p 对 A498 细胞中 miR-125a-5p、STAT3 mRNA 表达的影响

Fig.2 Effects of over-expression of miR-125a-5p on expression of miR-125a-5p and STAT3 mRNA in A498 cells

2.4 过表达 miR-125a-5p 或 STAT3 对 A498 细胞增殖、凋亡的影响

CCK-8、流式术检测结果(图4)显示,与 NC 组相比, miR-125a-5p mimics 组细胞增殖活性显著下降、

凋亡率显著上升, pLV-STAT3 组细胞增殖活性显著上升、凋亡率显著下降(均 $P < 0.05$); 与 pLV-STAT3 组相比, pLV-STAT3 mimics 组细胞增殖活性显著下降、凋亡率显著上升(均 $P < 0.05$)。



A: The potential binding sites between miR-125a-5p and STAT3 by bioinformatics predicts; B: The luciferase activities; C: Expression of STAT3 and p-STAT3 in cells (WB graph); D: Expression of STAT3 and p-STAT3 in cells (histogram)

图3 miR-125a-5p和STAT3的靶向关系

Fig.3 Targeting relationship between miR-125a-5p and STAT3

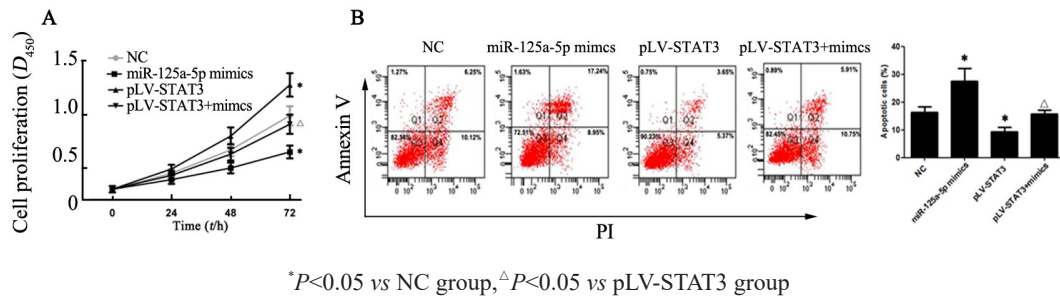


图4 miR-125a-5p、STAT3过表达对A498细胞增殖(A)和凋亡(B)的影响

Fig.4 Effects of over-expression of miR-125a-5p or STAT3 on proliferation (A) and apoptosis (B) of A498 cells

2.5 过表达miR-125a-5p或STAT3对A498细胞中Bcl-2、BAX、p21及cl-caspase-3表达的影响

WB检测结果(图5)显示,与NC组相比,miR-125a-5 pmimics组Bcl-2的表达显著下降,BAX、p21及cl-caspase-3的表达显著上升;pLV-STAT3组Bcl-2的表达显著上升,BAX、p21及cl-caspase-3的表达显著下降(均 $P < 0.05$)。与pLV-STAT3组相比,pLV-STAT3 mimics组Bcl-2的表达显著下降,BAX、p21及cl-caspase-3的表达显著上升(均 $P < 0.05$)。

2.6 过表达miR-125a-5p或STAT3对A498细胞侵袭的影响

Transwell实验检测结果(图6)显示,与NC组相比,miR-125a-5pmimics组侵袭细胞数显著下降,pLV-STAT3组侵袭细胞数显著上升(均 $P < 0.05$);与pLV-STAT3组相比,pLV-STAT3 mimics组侵袭细胞数显著下降(均 $P < 0.05$)。

2.7 过表达miR-125a-5p或STAT3对A498细胞中N-cadherin、E-cadherin、VEGF及HIF-1表达的影响

WB检测结果(图7)显示,与NC组相比,miR-125a-5pmimics组N-cadherin、VEGF及HIF-1的表达显著下降,E-cadherin的表达显著上升,pLV-STAT3组N-cadherin、VEGF及HIF-1的表达显著上升,E-cadherin的表达显著下降(均 $P < 0.05$);与pLV-STAT3组相比,pLV-STAT3 mimics组N-cadherin、VEGF及HIF-1的表达显著下降,E-cadherin的表达显著上升(均 $P < 0.05$)。

3 讨论

miRNA与肿瘤的生物过程紧密相关,而一种miRNA可能调控着数百个靶基因,miRNA可能介导靶基因的表达参与肿瘤的发生发展^[10]。研究^[11-13]证实,miR-125a-5p是多种肿瘤的潜在抑癌基因,但其对

肾癌生物学特性的影响及其机制尚不明确。本研究通过qPCR检测miR-125a-5p在肾癌组织和细胞中的表达,发现miR-125a-5p在肾癌组织和肾癌细胞中呈低表达,表明miR-125a-5p可能是肾癌的抑癌基因。为探讨miR-125a-5p对肾癌的具体作用,将miR-

125a-5p模拟物转染至肾癌细胞A498中,发现过表达miR-125a-5p会抑制细胞A498的增殖和侵袭,并促进其凋亡,进一步验证miR-125a-5p在肾癌中的抑癌作用。

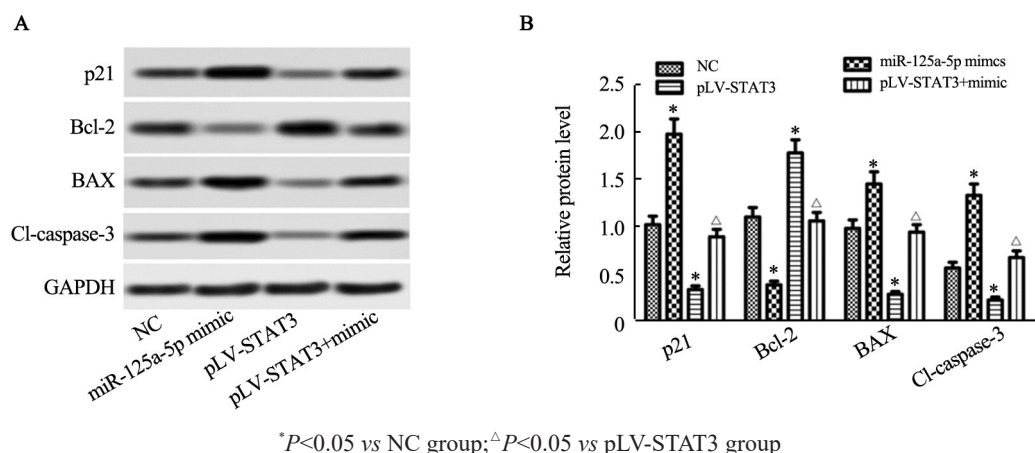


图5 miR-125a-5p、STAT3过表达对A498细胞中Bcl-2、BAX、p21及cl-caspase-3表达的影响

Fig.5 Effects of over-expression of miR-125a-5p or STAT3 on expression of Bcl-2, BAX, p21 and cl-caspase-3 in A498 cells

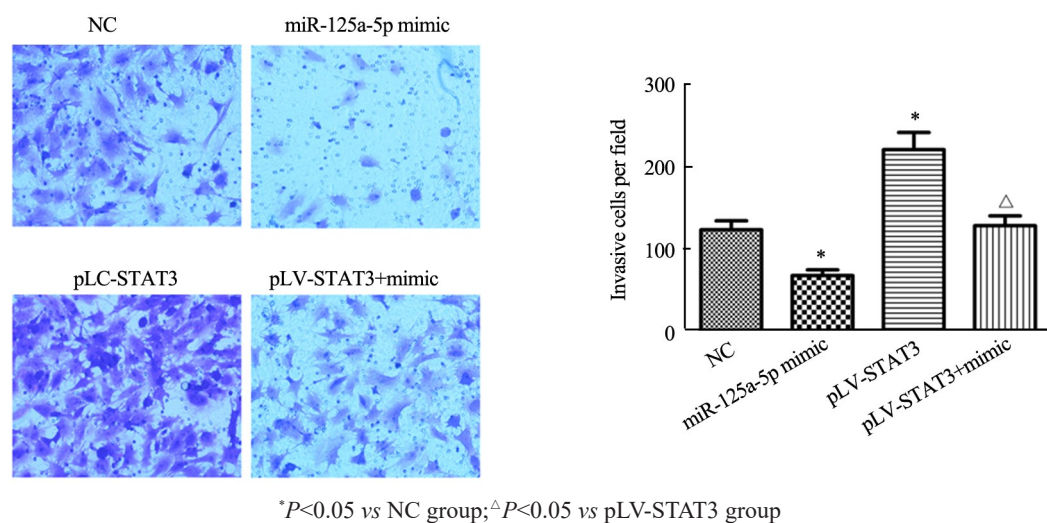


图6 miR-125a-5p、STAT3过表达对A498细胞侵袭能力的影响(x400)

Fig.6 Effects of over-expression of miR-125a-5p or STAT3 on invasion ability of A498 cells (x400)

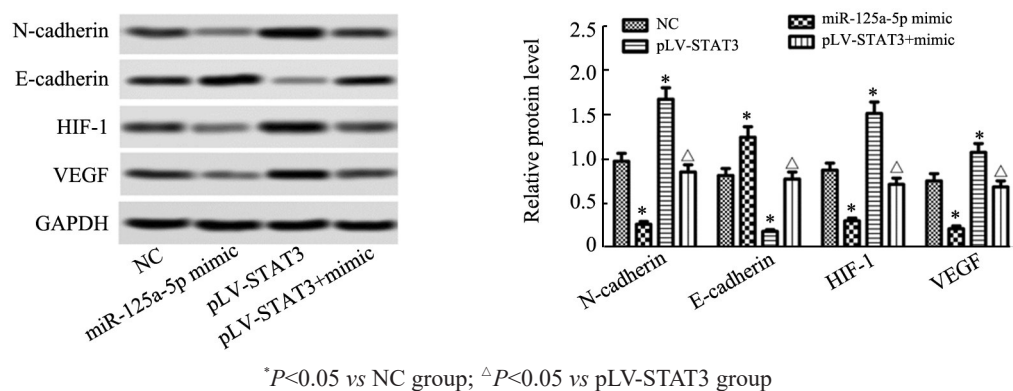


图7 miR-125a-5p、STAT3过表达对A498细胞中N-cadherin、E-cadherin、VEGF及HIF-1表达的影响

Fig.7 Effects of over-expression of miR-125a-5p or STAT3 on expression of N-cadherin, E-cadherin, VEGF and HIF-1 in A498 cells

STAT3是由多聚体激活的潜在转录因子, STAT3的激活参与细胞增殖、分化、凋亡、侵袭与转移等多种生理活动,持续性激活STAT3可导致细胞恶性增殖,故STAT3也被称为癌基因^[14]。夏仁飞等^[15]发现,西黄丸含药血清可通过抑制STAT3的激活,从而抑制肾癌786-O细胞增殖与侵袭,提示激活的STAT3可促进肾癌的发生发展。本研究通过TargetScan3.1、Mirbase和miRanda等生物信息学软件分析发现,STAT3可能是miR-125a-5p的靶基因,双荧光素酶实验表明miR-125a-5p可与STAT3的3'-UTR相互作用,且过表达miR-125a-5p可下调STAT3及其磷酸化蛋白的表达,均表明STAT3为miR-125a-5p的靶基因。为验证miR-125a-5p是否通过调节STAT3在肾癌细胞中发挥作用,本研究通过构建重组表达载体pLV-STAT3、pLV-STAT3+miR-125a-5p mimics,发现过表达STAT3可促进A498细胞的增殖、侵袭,并抑制其凋亡,而共表达STAT3和miR-125a-5p可逆转上述过程,进一步揭示miR-125a-5p通过下调STAT3的表达,抑制A498细胞的增殖、侵袭,并促进其凋亡。

Bcl-2、BAX、cl-caspase-3是凋亡相关因子^[16-17]。XIANG等^[18]研究显示,STAT3参与调控细胞凋亡基因Bcl-2家族、Caspase-3等蛋白的表达。p21是周期蛋白依赖激酶抑制基因;张文根^[19]等研究发现,白藜芦醇可通过上调p21、BAX及Caspase-3的表达,促进肾癌细胞786-O的凋亡,表明p21、BAX及Caspase-3参与调控肾癌细胞凋亡过程。本研究发现,miR-125a-5p可通过靶向STAT3下调Bcl-2的表达而上调BAX、p21及cl-caspase-3的表达,从而促进A498细胞的凋亡。LABERNADIE等^[20]研究发现,N-cadherin、E-cadherin可通过黏附成纤维细胞促使癌细胞侵袭。周芳芳^[21]等研究表明,VEGF、HIF-1参与血管生成,进而促进肿瘤细胞的转移。本研究发现miR-125a-5p可通过靶向STAT3上调E-cadherin的表达而下调N-cadherin、VEGF及HIF-1的表达,从而抑制A498细胞的侵袭。

综上所述,miR-125a-5p在肾癌组织和细胞呈低表达,可通过下调其靶基因STAT3抑制A498细胞的增殖和侵袭,并促进其凋亡,其具体分子机制可能为:(1)下调Bcl-2的表达,上调BAX、p21及cl-caspase-3的表达,从而促进A498细胞的凋亡;(2)上调E-cadherin的表达,下调N-cadherin、VEGF及HIF-1的表达,从而抑制A498细胞的侵袭。

[参 考 文 献]

- [1] WONG E C L, KAPOOR A. Epidemiology of prostate and kidney cancer in the Aboriginal population of Canada: A systematic review [J/OL]. *Can Urol Assoc J*, 2017, 11(5): E222-E232[2019-07-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5426945/>. DOI: 10.5489/cuaj.4185.
- [2] FABRIZIO F P, COSTANTINI M, COPETTI M, et al. Keap1/Nrf2 pathway in kidney cancer: frequent methylation of KEAP1 gene promoter in clear renal cell carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(7): 11187-11198. DOI:10.18632/oncotarget.14492.
- [3] DAYAL H, KINMAN J. Epidemiology of kidney cancer[J]. *Semin Oncol*, 2015, 10(4):366-377.
- [4] LI Y, HU L Y, XIA Q H, et al. The impact of metformin use on survival in kidney cancer patients with diabetes: a meta-analysis[J]. *Int Urol Nephrol*, 2017, 49(6): 975-981. DOI: 10.1007/s11255-017-1548-4.
- [5] 符芳姿, 许振胜. 阿昔替尼与索拉非尼一线治疗晚期肾癌的临床疗效[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(9):1006-1009.
- [6] NIKOLIC I, ELSWORTH B, DODSON E, et al. Discovering cancer vulnerabilities using high-throughput micro-RNA screening[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(22): 12657-12670. DOI: 10.1093/nar/gkx1072.
- [7] WONG N W, CHEN Y H, CHEN S, et al. OncomiR: an online resource for exploring pan-cancer microRNA dysregulation[J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(4): 713-715. DOI: 10.1093/bioinformatics/btx627.
- [8] SUN Y N, LIU X H, ZHANG Q F, et al. Oncogenic potential of TSTA3 in breast cancer and its regulation by the tumor suppressors miR-125a-5p and miR-125b[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(4): 4963-4972. DOI:10.1007/s13277-015-4178-4.
- [9] ZHONG L, SUN S Y, SHI J H, et al. MicroRNA-125a-5p plays a role as a tumor suppressor in lung carcinoma cells by directly targeting STAT3[J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(6): 1010428317697579. DOI: 10.1177/1010428317697579.
- [10] MARKOPOULOS G S, ROUPAKIA E, TOKAMANI M, et al. A step-by-step microRNA guide to cancer development and metastasis [J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2017, 40(4): 303-339. DOI: 10.1007/s13402-017-0341-9.
- [11] NATALIA M, ALEJANDRO G, VIRGINIA T V J, et al. MARK1 is a novel target for miR-125a-5p: implications for cell migration in cervical tumor cells[J]. *MicroRNA*, 2018, 7(1): 54-61. DOI:10.2174/2211536606666171024160244.
- [12] WANG R J, ZHENG Y H, WANG P, et al. Serum miR-125a-5p, miR-145 and miR-146a as diagnostic biomarkers in non-small cell lung cancer[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(1):765-771.
- [13] LEOTTA M, BIAMONTE L, RAIMONDI L, et al. A p53-dependent tumor suppressor network is induced by selective miR-125a-5p inhibition in multiple myeloma cells[J]. *J Cell Physiol*, 2014, 229(12): 2106-2116. DOI:10.1002/jcp.24669.
- [14] ZHAO Z H, LV B, ZHANG L, et al. miR-202 functions as a tumor suppressor in non-small cell lung cancer by targeting STAT3[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(2): 2281-2289. DOI: 10.3892/mmr.2017.6841.
- [15] 夏仁飞, 刘如敏, 周敏捷, 等. 西黄丸对肾癌细胞的增殖、侵袭及STAT3激活的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(2): 743-745.
- [16] ZHENG P F, WANG W F, JI M X, et al. TMEM119 silencing inhibits cell viability and causes the apoptosis of gastric cancer SGC-7901 cells[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(6): 8281-8286. DOI: 10.3892/ol.2018.8358.

- [17] NG P Y, CHYE S M, NG C H H, et al. Clinacanthus nutans hexane extracts induce apoptosis through a caspase-dependent pathway in human cancer cell lines[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2017, 18(4): 917-926. DOI:10.22034/APJCP.2017.18.4.917.
- [18] XIANG Y K, YE W, HUANG C H, et al. Brusatol inhibits growth and induces apoptosis in pancreatic cancer cells via JNK / p38 MAPK/NF- κ b/Stat3/Bcl-2 signaling pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 487(4): 820-826. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.04.133.
- [19] 张文银, 谭宇蕙, 王小兰, 等. 白藜芦醇诱导肾癌细胞凋亡的分子机制研究[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(9): 2064-2066.
- [20] LABERNADIE A, KATO T, BRUGUÉS A, et al. A mechanically active heterotypic E-cadherin/N-cadherin adhesion enables fibroblasts to drive cancer cell invasion[J]. Nat Cell Biol, 2017, 19(3): 224-237. DOI:10.1038/ncb3478.
- [21] 周芳芳, 卢林明, 陈冰. 食管鳞状细胞癌中 HIF-1 α 、CTSD 表达和血管生成拟态的关系及其临床意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2017, 33(9): 977-981. DOI:10.13315/j.cnki.cjcep.2017.09.008.

[收稿日期] 2019-07-23

[修回日期] 2019-10-23

[本文编辑] 黄静怡