

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.01.008

· 基础研究 ·

miR-361-5p 对肾细胞癌 ACHN 细胞恶性生物学行为的影响

余枫, 谢亚平, 叶莹, 夏洪(武汉市武昌医院 肾内科, 湖北 武汉 430063)

[摘要] **目的:**探讨 miR-361-5p 对肾细胞癌 ACHN 细胞增殖、侵袭、迁移、凋亡及其细胞周期的影响。**方法:**将 miR-361-5p mimics 和 miR-361-5p inhibitor 分别转染至肾癌 ACHN 细胞中,用 qPCR 检测转染细胞中 miR-361-5p 的表达水平,用 MTT 法、划痕愈合实验、Transwell 实验、流式细胞术分别检测细胞的增殖、迁移、侵袭、细胞周期和凋亡水平。**结果:**与空白对照组和 Mimics-NC 组比较,miR-361-5p mimics 组 ACHN 细胞中 miR-361-5p 表达水平显著升高($P<0.01$),细胞的增殖、侵袭和迁移能力均显著减弱(均 $P<0.01$),而凋亡率升高($P<0.01$)。与空白对照组或 Inhibitor-NC 组比较,miR-361-5p inhibitor 组细胞中 miR-361-5p 表达水平显著下降($P<0.01$),细胞的增殖、侵袭和迁移能力均增强(均 $P<0.01$),细胞周期运转加速($P<0.01$),凋亡率降低($P<0.05$)。**结论:**miR-361-5p 可抑制肾癌 ACHN 细胞的增殖、侵袭和迁移,并诱导细胞凋亡,其在肾癌发生发展过程中发挥重要的抑制作用。

[关键词] 肾癌; ACHN 细胞; miR-361-5p; 增殖; 迁移; 侵袭; 细胞周期

[中图分类号] R737.11; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)01-0050-05

Effects of miR-361-5p on malignant biological behaviors of renal cell carcinoma ACHN cells

YU Feng, XIE Yaping, YE Ying, XIA Hong (Department of Urology, Wuchang Hospital of Wuhan City, Wuhan 430063, Hubei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of miR-361-5p on proliferation, invasion, migration, apoptosis and cell cycle of renal cell carcinoma ACHN cells. **Methods:** MiR-361-5p mimics and miR-361-5p inhibitor were transfected into ACHN cells, respectively. The expression of miR-361-5p in the transfected cells was detected by Real-time quantitative PCR; and the proliferation, migration, invasion, cell cycle and apoptosis of cells were detected by MTT assay, Scratch-healing assay, Transwell assay and flow cytometry, respectively. **Results:** Compared with the control group and mimics-NC group, the expression of miR-361-5p was increased significantly in ACHN cells of -miR-361-5p mimics group ($P<0.01$), the abilities of cell proliferation, invasion and migration were decreased significantly (all $P<0.01$), and the apoptosis rate was increased ($P<0.01$). Compared with the control group or inhibitor-NC group, the expression of miR-361-5p was significantly decreased in ACHN cells of miR-361-5p inhibitor group ($P<0.01$), the abilities of cell proliferation, invasion and migration were increased (all $P<0.01$), the cell cycle was accelerated ($P<0.01$), and the apoptosis rate was decreased ($P<0.05$). **Conclusion:** miR-361-5p can inhibit the proliferation, invasion and migration of renal cell carcinoma ACHN cells, and induce cell apoptosis, which plays an important inhibitory role in the development of renal cell carcinoma.

[Key word] renal cell carcinoma; ACHN cell; miR-361-5p; proliferation; migration; invasion; cell cycle

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(1): 50-54. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.01.008]

肾细胞癌(简称肾癌)起源于肾实质泌尿管上皮系统,是泌尿系统中最常见的恶性肿瘤之一。肾癌的发病率在世界范围内的差异较大,目前的治疗主要通过外科手术部分切除和化学治疗^[1]。对于转移性肾癌,传统疗法很难达到预期的疗效,靶向治疗则成为针对转移性肾癌的标准辅助治疗手段^[2]。微小核糖核酸(microRNA, miRNA)是一种短序列 RNA,不编码蛋白质,但能通过其 3' UTR 互补结合从而调控基因的表达^[3]。研究^[4]发现,基因组中约有 50% 的 miRNA 定位于与肿瘤相关的脆性位点,在胃癌细胞中过表达 miR-361-5p 可抑制 MMP-3、MMP-9 和 VEGF 的表达,进而抑制胃癌细胞

的增殖。过表达 miR-361-5p 可通过抑制 EGFR/PI3K/Akt 信号通路从而抑制三阴性乳腺癌细胞的增殖^[5]。HOU 等^[6]研究发现,miR-361-5p 过表达在肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭过程中起到抑制作用。因此,miR-361-5p 在多种癌症细胞中发挥抑癌作用,但其在肾癌中的相关研究却鲜有报道。因此,本研究通过过表达或干扰 miR-361-5p 表达来探讨 miR-361-5p 对肾癌 ACHN 细胞增殖、迁移、侵袭、凋亡及其细胞周期的影

[作者简介] 余枫(1981-), 学士, 主治医师, 主要从事急慢性肾脏疾病的研究, Email: 382867363@qq.com

[通信作者] 夏洪(XIA Hong, corresponding author), 学士, 副主任医师, 主要从事糖尿病肾病的研究, Email: 5747244@qq.com

响,分析miR-361-5p在肾癌发展过程中的作用,以期
为肾癌的临床治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 细胞系及主要试剂

肾癌细胞株ACHN购自中国科学院上海细胞
库。TRIzol购自Ambion公司,YBR Green PCR试剂
盒购自KAPA Biosystems公司,逆转录试剂盒购自
TaKaRa公司, MEM和胎牛血清购自Gibco公司,
miR-361-5p模拟物(mimics)和miR-361-5p抑制剂
(inhibitor)购自Invitrogen公司,PBS、0.25%胰蛋白
酶、MTT溶液、瑞氏-姬姆萨复合染液和流式细胞术
专用缓冲液购自武汉Bioswamp公司,DMSO购自
SIGMA公司,AnnexinV-FITC/PI凋亡检测试剂盒、
Cycletest™ Plus DNA Reagent Kit、结晶紫染色液和基
质胶(Matrigel胶)购自BD公司。

1.2 细胞培养、转染及分组

从液氮罐中取出冻存ACHN细胞,37℃水浴
融解后,将细胞悬液转移到离心管中,100×g离心
3 min,吸弃上清,重悬细胞,加入含10%血清的新培
养基,置于37℃、5%CO₂的培养箱内继续培养。

取对数生长期ACHN细胞进行细胞转染。依据
转染质粒的不同,实验分为miR-361-5p-mimics、miR-
361-5p-inhibitor、Mimics-NC、Inhibitor-NC和空白对
照组5组。取1 μl miR-361-5p-mimics或miR-361-5p-
inhibitor加入到50 μl Opti-MEM中进行稀释,轻轻吹
吸3~5次混匀。用同样的方法稀释3 μl Lipo-
fectamine® RNAiMAX。将转染试剂和mimics或
inhibitor稀释液混匀,室温静置5 min,37℃、5% CO₂
培养箱中培养细胞48 h后检测转染效率。

1.3 qPCR检测ACHN细胞的转染效率

刮取细胞置于1 ml的TRIzol匀浆管中,提取细胞
总RNA。利用逆转录试剂盒进行RNA逆转录,按照
SYBR Green PCR试剂盒说明书进行PCR扩增。反应
条件:95℃预变性3 min;95℃变性5 s,56℃退火10 s,
72℃延伸25 s,共39个循环。PCR引物序列:miR-361-
5p F为5'-GGGTTATCAGAATCTCC-3',R为5'-
AACTGGTGTCTGGAGTCGGC-3';U6 F为5'-CTC
GCTTCGGCAGCAC-3',R为5'-AACGCTTCAC-
GAATTTGCGT-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算目的基因
mRNA的相对表达量。

1.4 MTT法检测ACHN细胞的增殖能力

收集对数生长期细胞,调整细胞悬液密度至
3×10⁴个/ml,置于37℃、5%CO₂培养箱中过夜培养。
细胞贴壁后取出细胞培养板,每孔加入20 μl MTT溶
液(5 mg/ml),继续培养4 h。弃上清后,加入150 μl

DMSO溶解液,低速振荡10 min,待结晶物充分溶解
后利用酶标仪检测490 nm处的光密度(D)值。根据
D值绘制细胞的增殖曲线。

1.5 划痕愈合实验检测ACHN细胞的迁移能力

先用标记笔在6孔板背后每隔0.5~1.0 cm画一
道横线,每孔至少穿过5条线。在每孔中加入约
1×10⁶个细胞,次日用10 μl的枪头在单层细胞上划
痕,然后用PBS冲洗掉划下的细胞,加入无血清培养
液,置于37℃、5%CO₂培养箱中培养。在0、24、48、
72 h分别拍照,观察细胞的迁移距离。

1.6 Transwell实验检测ACHN细胞的侵袭能力

将不同分组的ACHN细胞换成无血清培养基,
培养24 h。在预铺Matrigel胶的Transwell上小室内
接种用1% FBS的培养基稀释的1×10⁵个/ml细胞悬
液(每个小室加0.5 ml),下小室加入0.75 ml含10%
胎牛血清的培养液,37℃培养24 h后,取出Transwell
小室,每孔加入1 ml 4%甲醛溶液,室温固定10 min,
用0.5%结晶紫染色30 min后晾干,置于光学显微镜
下观察,计数穿膜细胞。

1.7 Annexin V-FITC/PI染色流式细胞术检测ACHN 细胞的凋亡

吸取培养液到离心管中,PBS洗涤1次后加入适
量的胰酶细胞消化液消化细胞。轻轻敲打贴壁细胞
并除去消化液。加入细胞培养液,稍混匀,转移至离
心管内,100×g离心5 min,弃上清,收集细胞,用PBS
轻轻重悬细胞并计数。取(5~10)×10⁴个细胞,离心去
上清,加入1 ml预冷的PBS重悬细胞,离心弃上清,
重复2次;将细胞重悬于200 μl结合缓冲液中;加入
10 μl Annexin V-FITC和10 μl PI,轻轻摇匀,4℃避光
孵育30 min后加入300 μl结合缓冲液,置于流式细胞
仪上检测细胞的凋亡情况。

1.8 流式细胞术检测ACHN细胞的细胞周期

用0.25%胰酶消化不同组别的细胞,使其成
为单个细胞,充分吹打混匀细胞悬液并收集至
流式专用管中;100×g离心5 min,弃上清,利用
300 μl含有10%胎牛血清的PBS悬浮沉淀,加入700
μl无水乙醇,置于-20℃冰箱内固定细胞24 h以上;
900×g离心30 s,弃上清;用1 ml预冷的PBS将样品洗
涤2次后,用100 μl RNase A溶液(1 mg/ml)沉淀细
胞,37℃培养;加入400 μl PI溶液避光染色10 min
后,用流式细胞仪测定DNA含量以及细胞在各细胞
周期所占比例。

1.9 统计学处理

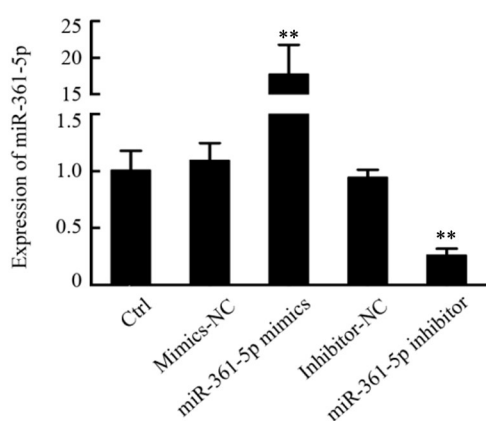
qPCR、MTT、划痕愈合、Transwell、流式细胞术等
实验均重复3次。所有数据采用SPSS 18.0统计学软
件进行统计分析。正态分布的计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,

两组间比采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外源物转染对ACHN细胞中miR-361-5p表达的影响

qPCR 实验结果(图1)显示, 与空白对照组和 Mimics-NC 组比较, miR-361-5p mimics 组 ACHN 细胞中 miR-361-5p 表达水平显著升高(均 $P < 0.01$); 与空白对照组和 Inhibitor-NC 组比较, miR-361-5p inhibitor 组细胞中 miR-361-5p 表达水平显著下降(均 $P < 0.01$)。结果表明, ACHN 细胞中成功转染 miR-361-5p mimics 和 miR-361-5p inhibitor 等。



** $P < 0.01$ vs Ctrl or Mimics-NC or Inhibitor-NC group

图1 外源物转染对ACHN细胞中miR-361-5p表达的影响

Fig. 1 Effects of exogenous transfection on expression of miR-361-5p in ACHN cells

2.2 miR-361-5p过表达可显著降低ACHN细胞的增殖能力

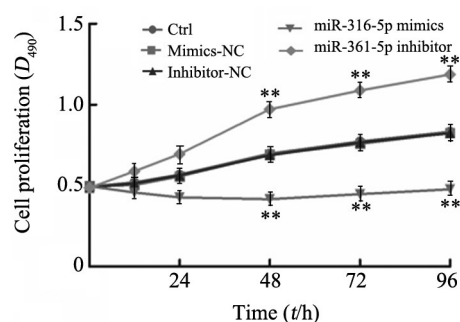
MTT 实验结果(图2)显示, miR-361-5p mimics 组 ACHN 细胞的增殖能力明显低于对照组和 Mimics-NC 组(均 $P < 0.01$), miR-361-5p inhibitor 组细胞的增殖能力明显高于对照组和 Inhibitor-NC 组(均 $P < 0.01$)。

2.3 miR-361-5p过表达对ACHN细胞迁移能力的影响

划痕愈合实验结果(图3A)显示, 在转染24 h时, 各组细胞的迁移能力差异无统计学意义($P < 0.05$); 转染48和72 h后, 与对照组和 Mimics-NC 或 Inhibitor-NC 组比较, miR-361-5p mimics 组细胞的迁移能力显著减弱(均 $P < 0.05$), miR-361-5p inhibitor 组的迁移能力增强(均 $P < 0.05$)。Transwell 实验结果(图3B)显示, 与对照组和 Mimics-NC 组比较, miR-361-5p mimics 组侵袭细胞数显著减少(均 $P < 0.01$), miR-361-5p inhibitor 组侵袭细胞数显著增多(均 $P < 0.01$)。

2.4 miR-361-5p过表达对ACHN细胞细胞周期和凋亡的影响

流式细胞术检测结果(图4)显示, 与对照组和 Mimics-NC 组或 Inhibitor-NC 组比较, miR-361-5p mimics 组 G1 期细胞比例无明显变化(均 $P > 0.05$), miR-361-5p-inhibitor 组 G1 期细胞数量显著减少(均 $P < 0.01$, 图4A), 提示 miR-361-5p-inhibitor 可加速 ACHN 细胞周期运转; miR-361-5p mimics 组的细胞凋亡率显著升高($P < 0.01$), miR-361-5p inhibitor 组的细胞凋亡率显著降低(均 $P < 0.05$, 图4B)。



** $P < 0.01$ vs Ctrl or mimics-NC or Inhibitor-NC group

图2 过表达或抑制miR-361-5p对ACHN细胞增殖能力的影响

Fig. 2 Effects of over-expression or inhibition of miR-361-5p on the proliferation ability of ACHN cells

3 结论

一直以来, 肾癌缺乏有效的治疗方法, 其发病率逐步上升, 预后极差, 患者总体5年生存率为74%, 部分患者低至53%, 而转移性肿瘤患者甚至低于8%^[7]。以往对于肾癌的治疗仅限于细胞因子疗法, 但该方法低效、高毒, 不适合用于临床治疗。随着科技的发展, 肾癌的治疗方法也在不断演变, 分子靶向治疗引起了学者们的浓厚兴趣, 成为一种具有应用前景的治疗方法^[8]。

miRNA 是一类单链非编码小 RNA, 成熟的 miRNA 的长度通常为 18~25 个核苷酸, 不能编码形成蛋白质, 一般是通过与特定 mRNA 靶标的 3' 非翻译区相互作用以转录后方式负调控基因表达^[9]。miRNA 在包括细胞增殖、代谢和凋亡等生物过程中发挥着至关重要的作用^[10-13]。ZEB1/2-miR-200 是肿瘤转移和 EMT 的驱动力, 并在肾小管上皮细胞中起作用^[14]。谭海颂^[15]研究发现, miR-193b-3p 能够显著地抑制肾癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 在肾透明细胞癌的疾病进程中起着关键的抑癌作用; 并且 miR-193b-3p 能够靶向结合 MCL1、MMP19 和 E2F6 的 3'UTR 区, 负性调控其靶向基因的表达。

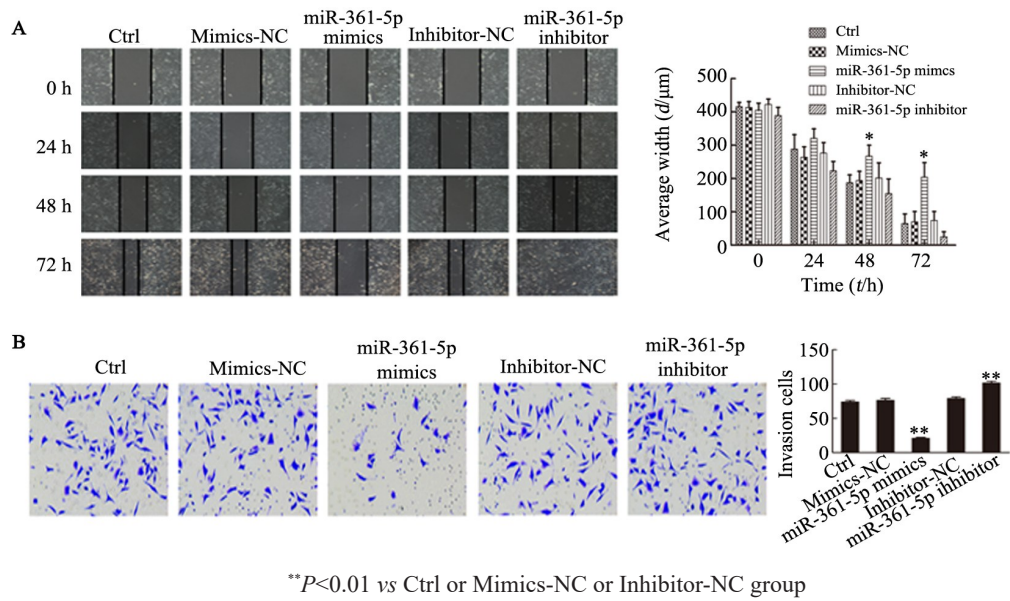


图3 miR-361-5p对ACHN细胞迁移(A)和侵袭(B)能力的影响(×100)

Fig.3 Effects of miR-361-5p on the migration (A) and invasion (B) ability of ACHN cell (×100)

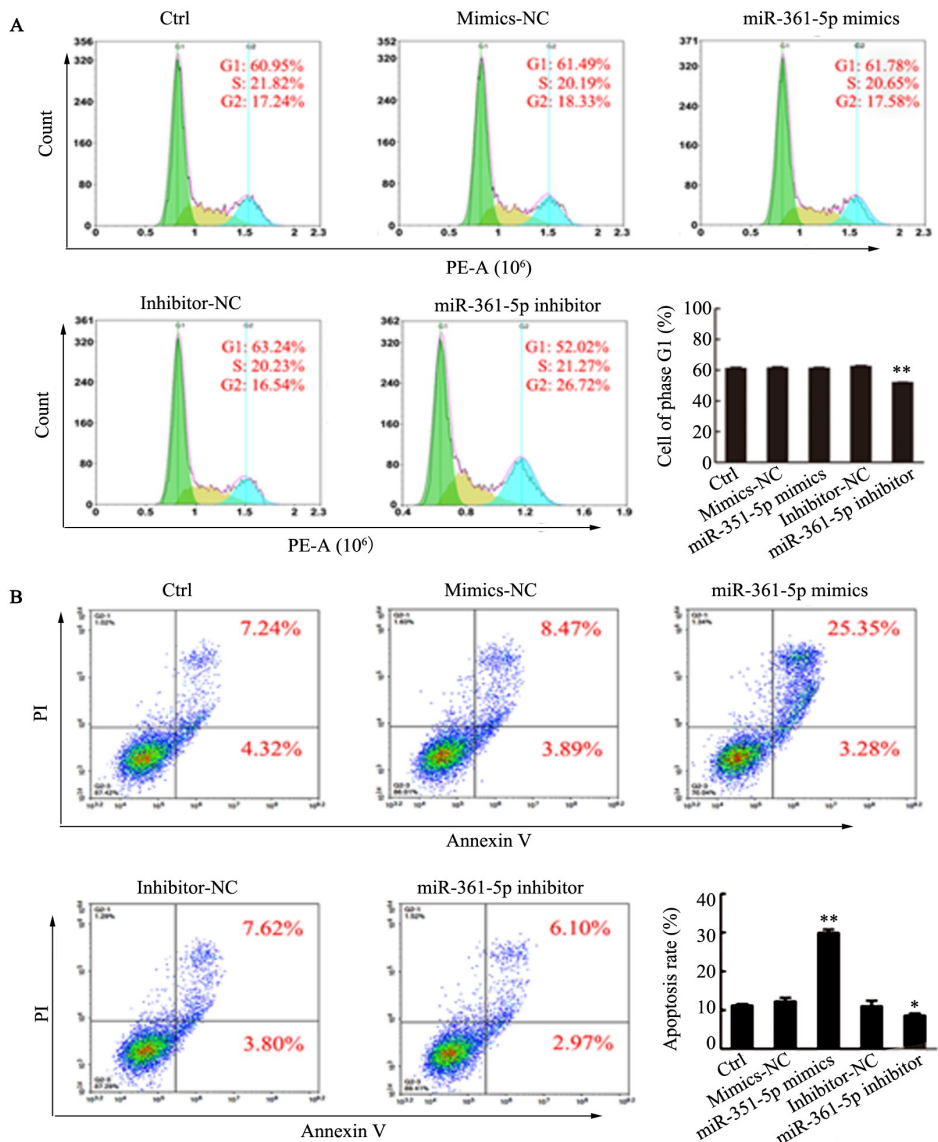


图4 miR-361-5p过表达对ACHN细胞周期(A)和凋亡(B)的影响

Fig.4 Effects of miR-361-5p on the cell cycle (A) and apoptosis (B) of ACHN cells

miR-361-5p 作为基因表达的关键调节因子, 它的失调与各种肿瘤的发生有关^[16]。miR-361-5p 能够抑制前列腺癌 PC3 细胞的增殖与侵袭, 从而发挥抑癌的作用^[17]。MA 等^[18]研究表明, miR-361-5p 过表达显著抑制结直肠癌和胃癌的生长和转移。CUI 等^[19]也发现, miR-361-5p mimics 抑制肝癌细胞的增殖和侵袭。肿瘤在发生发展过程中存在六大生物学特性: 维持增殖、避开生长抑制因子、抵抗凋亡、永久复制、诱导血管生成、激活迁移与侵袭^[20]。因此, 研究 miR-361-5p 对肾癌细胞增殖、迁移、侵袭、凋亡及细胞周期等的影响, 可更好地了解其对肾癌发展的调控作用。本研究结果显示, miR-361-5p 过表达可明显抑制 ACHN 细胞的增殖, 降低细胞的迁移和侵袭能力并诱导凋亡; 而抑制 miR-361-5p 表达后的作用与之相反, 促进肾癌细胞的增殖、迁移和侵袭, 加速细胞周期运转, 减少细胞凋亡。

综上所述, miR-361-5p 在肾癌的发生发展中发挥抑制作用, 但是其作用机制尚未明确, 仍需进一步深入研究, 探讨 miR-361-5p 及其靶基因, 可为靶向治疗肾癌提供新方向。

[参考文献]

- [1] LIU L J, YU J J, XU X L. MicroRNA-93 inhibits apoptosis and promotes proliferation, invasion and migration of renal cell carcinoma ACHN cells via the TGF- β /Smad signaling pathway by targeting RUNX3[J/OL]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(7): 3499-3513[2019-08-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5527264/>.
- [2] 卢丽华, 吴金斌, 余振东, 等. miR-452 在肾透明细胞癌中的异常表达研究[J]. *中国实验诊断学*, 2012, 16(2): 237-240. DOI:10.3969/j.issn.1007-4287.2012.02.017.
- [3] CALIN G A, SEVIGNANI C, DUMITRU C D, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(9): 2999-3004[2019-08-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC365734/>. DOI:10.1073/pnas.0307323101.
- [4] TIAN L, ZHAO Z F, XIE L, et al. MiR-361-5p inhibits the mobility of gastric cancer cells through suppressing epithelial-mesenchymal transition via the Wnt/ β -catenin pathway[J]. *Gene*, 2018, 675: 102-109. DOI:10.1016/j.gene.2018.06.095.
- [5] HAN J J, YU J J, DAI Y N, et al. Overexpression of miR-361-5p in triple-negative breast cancer (TNBC) inhibits migration and invasion by targeting RQCD1 and inhibiting the EGFR/PI₃K/Akt pathway[J/OL]. *Bosn J Basic Med Sci*, 2019, 19(1): 52-59[2019-08-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6387672/>. DOI: 10.17305/bjbms.2018.3399.
- [6] HOU X W, SUN X, YU Y, et al. MiR-361-5p suppresses lung cancer cell lines progression by targeting FOXM1[J]. *Neoplasma*, 2017, 64(4): 526-534. DOI:10.4149/neo_2017_406.
- [7] CHOUERI T K, MOTZER R J. Systemic therapy for metastatic renal-cell carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2017, 376(4): 354-366. DOI: 10.1056/NEJMra1601333.
- [8] POSADAS E M, LIMVORASAK S, FIGLIN R A. Targeted therapies for renal cell carcinoma[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2017, 13(8): 496-511. DOI:10.1038/nrneph.2017.82.
- [9] XU B, ZHANG Y W, TONG X H, et al. Characterization of microRNA profile in human cumulus granulosa cells: Identification of microRNAs that regulate Notch signaling and are associated with PCOS[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2015, 404: 26-36. DOI:10.1016/j.mce.2015.01.030.
- [10] LEE J, LIN J B, SUN F J, et al. Safety and efficacy of semiextended field intensity-modulated radiation therapy and concurrent cisplatin in locally advanced cervical cancer patients: An observational study of 10-year experience[J/OL]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(10): e6158[2019-08-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5348152/>. DOI:10.1097/MD.00000000000006158.
- [11] SUN M Y, WANG X P, TU C, et al. MicroRNA-216b inhibits cell proliferation and migration in human melanoma by targeting FOXM1 in vitro and in vivo[J]. *Cell Biol Int*, 2017, 41(12): 1272-1282. DOI:10.1002/cbin.10754.
- [12] OUIOMET M, EDIRIWEERA H N, GUNDRU U M, et al. MicroRNA-33-dependent regulation of macrophage metabolism directs immune cell polarization in atherosclerosis[J/OL]. *J Clin Invest*, 2015, 125(12): 4334-4348[2019-08-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4665799/>. DOI:10.1172/JCI181676.
- [13] IZREIG S, SAMBORSKA B, JOHNSON R M, et al. The miR-17~92 microRNA cluster is a global regulator of tumor metabolism[J]. *Cell Rep*, 2016, 16(7): 1915-1928. DOI:10.1016/j.celrep.2016.07.036.
- [14] XIONG M X, JIANG L, ZHOU Y, et al. The miR-200 family regulates TGF- β 1-induced renal tubular epithelial to mesenchymal transition through Smad pathway by targeting ZEB1 and ZEB2 expression[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2012, 302(3): F369-F379. DOI:10.1152/ajprenal.00268.2011.
- [15] 谭海颂. MiR-193b-3p 在肾透明细胞癌中的表达及其生物学作用的研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2017.
- [16] ZHANG X P, SHAO R X, GAO W W, et al. Inhibition of miR-361-5p suppressed pulmonary artery smooth muscle cell survival and migration by targeting ABCA1 and inhibiting the JAK2/STAT3 pathway[J]. *Exp Cell Res*, 2018, 363(2): 255-261. DOI:10.1016/j.yexcr.2018.01.015.
- [17] 刘大闯, 陶陶, 许斌, 等. miR-361-5p 对激素非依赖前列腺癌细胞 PC3 增殖、侵袭的影响[J]. *中国男科学杂志*, 2014, 28(8): 3-8. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0848.2014.08.001.
- [18] MA F, SONG H J, GUO B L, et al. MiR-361-5p inhibits colorectal and gastric cancer growth and metastasis by targeting staphylococcal nuclease domain containing-1[J/OL]. *Oncotarget*, 2015, 6(19): 17404-17416[2019-08-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4627317/>. DOI:10.18632/oncotarget.3744.
- [19] CUI W X, LI Y G, XU K Q, et al. MiR-361-5p inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation and invasion by targeting VEGFA [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 479(4): 901-906. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.09.076.
- [20] HANAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646-674. DOI:10.1016/j.cell.2011.02.013.

[收稿日期] 2019-08-09

[修回日期] 2019-11-14

[本文编辑] 党瑞山