

- [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(3): 204-208.
- [8] BENSON R, PATHY S, KUMAR L, et al. Locally advanced cervical cancer - neoadjuvant chemotherapy followed by concurrent chemoradiation and targeted therapy as maintenance: a phase II study[J]. J Cancer Res Ther, 2019, 15(6): 1359-1364.
- [9] 胡敏. 宫颈病变382例高危人乳头瘤病毒亚型分布及其与宫颈癌的相关性分析[J]. 安徽医药, 2020, 24(12): 2439-2442.
- [10] GE Y, ZHENG N, CHEN X, et al. Gmdtc chelating agent attenuates cisplatin-induced systemic toxicity without affecting antitumor efficacy[J]. Chem Res Toxicol, 2019, 32(8): 1572-1582.
- [11] 彭敏, 王锡恩, 王幼辉. miR-3142在宫颈癌HeLa细胞生长及顺铂耐药中的作用机制[J]. 中华内分泌外科杂志, 2020, 14(6): 476-481.
- [12] LIU YC, CHANG PY, CHAO CC. CITED2 silencing sensitizes cancer cells to cisplatin by inhibiting p53 trans-activation and chromatin relaxation on the ERCC1 DNA repair gene[J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(22): 10760-10781.
- [13] 叶鑫鑫, 王亚军. P-糖蛋白与宫颈癌顺铂化疗耐药关系及相关机制的研究进展[J]. 海南医学, 2021, 32(10): 1305-1309.
- [14] 刘孝荣, 马东礼, 文飞球. DNA修复系统与肿瘤发生和治疗关系的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2018, 26(3): 469-474.
- [15] 张龙, 宋建东, 刘丽学, 等. ERCC1和ERCC2基因多态性与宫颈癌易感性的相关性研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2020, 29(8): 807-810.
- [16] 祁丽芳, 吕杰强, 朱雪琼, 等. ERCC1、XPD、XPC单核苷酸多态性与局部晚期宫颈癌新辅助化疗敏感性相关性[J]. 温州医科大学学报, 2016, 46(10): 724-729.
- [17] ZHANG W, OU J, LEI F, et al. C14ORF166 overexpression is associated with pelvic lymph node metastasis and poor prognosis in uterine cervical cancer[J]. Tumour Biol, 2016, 37(1): 369-379.
- [18] 梁军, 吕红英, 张克, 等. ERCC1和XRCC1基因多态性与接受奥沙利铂化疗晚期大肠癌患者生存期的关系[J]. 中国肿瘤临床, 2008, 35(18): 1068-1072.
- [19] 徐向勇, 许平, 王旭, 等. ERCC1基因多态性和蛋白表达与晚期非小细胞肺癌的TP化疗疗效关系的研究[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(9): 1233-1235.
- [20] 田丹, 李新, 尚学琴, 等. 长链非编码RNA UC001kfo表达水平与宫颈癌病人预后的相关性研究[J]. 安徽医药, 2019, 23(10): 1971-1974.

(收稿日期: 2020-02-02, 修回日期: 2022-01-06)

引用本文: 闫凡, 黄彩虹. 下调微小RNA-183表达对肾母细胞瘤SK-NEP-1细胞增殖凋亡的影响及机制[J]. 安徽医药, 2022, 26(3): 553-557. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2022.03.031.

◇临床医学◇



下调微小RNA-183表达对肾母细胞瘤SK-NEP-1细胞增殖凋亡的影响及机制

闫凡, 黄彩虹

作者单位: 榆林市第一医院小儿二科, 陕西 榆林 718000

通信作者: 黄彩虹, 女, 副主任医师, 研究方向为儿内科(哮喘、呼吸), Email: 501353198@qq.com

摘要: 目的 探讨下调微小RNA(miR)-183表达对肾母细胞瘤SK-NEP-1细胞增殖凋亡的影响及机制。方法 2018年12月至2019年7月, 体外培养SK-NEP-1细胞, 分为对照组(细胞正常培养)、抑制剂阴性对照组(Anti-NC组)(转染Anti-NC至SK-NEP-1细胞)、miR-183抑制剂组(Anti-miR-183组)(转染Anti-miR-183至SK-NEP-1细胞)、Anti-miR-183+小干扰RNA阴性序列(si-NC)组(共转染Anti-miR-183和si-NC至SK-NEP-1细胞)和Anti-miR-183+程序性细胞死亡4小干扰RNA(si-PDCD4)组(共转染Anti-miR-183和si-PDCD4至SK-NEP-1细胞), 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)测定miR-183, MTT法检测细胞增殖变化, 平板克隆实验检测细胞克隆能力, 流式细胞术测定细胞凋亡变化, 蛋白质印迹法(Western blotting)检测细胞中活化胱天蛋白酶-3(cleaved-caspase-3)和PDCD4蛋白水平。双荧光素酶报告基因实验验证miR-183与PDCD4的靶向关系。结果 Anti-miR-183组miR-183表达水平为(0.32±0.04), 显著低于Anti-NC组(0.98±0.11)($P<0.05$)。Anti-miR-183组细胞增殖活性为(0.20±0.02)、克隆形成数为(213.69±20.94)个, 均低于Anti-NC组[(0.40±0.03)、(312.87±22.28)个]($P<0.05$); Anti-miR-183组细胞凋亡率为(16.47±1.58)%、cleaved-caspase-3蛋白水平为(0.69±0.09), 均高于Anti-NC组[(2.36±0.32)%、(0.27±0.04)]($P<0.05$)。对照组与Anti-NC组各检测指标比较均差异无统计学意义($P>0.05$)。PDCD4是miR-183的靶基因, 且Anti-miR-183组细胞中PDCD4蛋白水平为(0.89±0.07), 显著高于Anti-NC组(0.37±0.06)($P<0.05$)。Anti-miR-183+si-PDCD4组细胞增殖活性为(0.32±0.04), 克隆形成数为(286.47±20.65)个, PDCD4蛋白水平为(0.45±0.05), 均高于Anti-miR-183+si-NC组[(0.21±0.03)、(216.20±13.68)个, (0.86±0.09)]($P<0.05$); Anti-miR-183组细胞凋亡率为(10.79±1.28)%、cleaved-caspase-3蛋白水平为(0.30±0.03), 均低于Anti-miR-183+si-NC组[(17.93±1.64)%、(0.72±0.08)]($P<0.05$)。结论 下调miR-183通过靶向调控PDCD4抑制肾母细胞瘤SK-NEP-1细胞增殖并诱导凋亡。

关键词: 肾母细胞瘤; 微小RNA-183; 凋亡; 胱天蛋白酶-3; PDCD4

Effect of down-regulation of miR-183 expression on proliferation and apoptosis of nephroblastoma SK-NEP-1 cells and its mechanism

YAN Fan, HUANG Caihong

Author Affiliation: Second Department of Pediatrics, First Hospital of Yulin City, Yulin, Shaanxi 718000, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of down-regulation of miR-183 on proliferation and apoptosis of nephroblastoma SK-NEP-1 cells and its mechanism. **Methods** From December 2018 to July 2019, SK-NEP-1 cells were cultured in vitro and assigned into control group (SK-NEP-1 cells were cultured normally), inhibitor negative control (Anti-NC) group (SK-NEP-1 cells were transfected with Anti-NC), miR-183 inhibitor (Anti-miR-183) group (SK-NEP-1 cells were transfected with Anti-miR-183), Anti-miR-183+small interfering RNA negative sequence (si-NC) group (SK-NEP-1 cells were co-transfected with Anti-miR-183 and si-NC) and Anti-miR-183+programmed cell death 4 small interfering RNA (si-PDCD4) group (SK-NEP-1 cells were co-transfected with Anti-miR-183 and si-PDCD4). Real-time fluorescence quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect miR-183. Tetrathiazolyl blue (MTT) assay was used to detect cell proliferation. Plate cloning assay was used to detect cell cloning ability. Apoptotic changes were measured by flow cytometry. Western blotting was used to detect the protein levels of cleaved-caspase-3 and PDCD4. The dual luciferase reporter gene experiment verified the targeting relationship between miR-183 and PDCD4. **Results** The expression level of miR-183 in the Anti-miR-183 group was (0.32 ± 0.04) , which was significantly lower than that in the Anti-NC group (0.98 ± 0.11) ($P < 0.05$). The cell proliferation activity of the Anti-miR-183 group was (0.20 ± 0.02) and the number of clones was (213.69 ± 20.94) , which were lower than those of the Anti-NC group $[(0.40 \pm 0.03), (312.87 \pm 22.28)]$ ($P < 0.05$). The apoptotic rate of the Anti-miR-183 group was $(16.47 \pm 1.58)\%$ and the level of cleaved-caspase-3 protein was (0.69 ± 0.09) , which were higher than those of the Anti-NC group $[(2.36 \pm 0.32)\%, (0.27 \pm 0.04), \text{respectively}]$ ($P < 0.05$). There was no statistically significant difference in the detection indicators between the control group and the Anti-NC group ($P > 0.05$). PDCD4 was identified as the target gene of miR-183, and the level of PDCD4 protein in the Anti-miR-183 group was (0.89 ± 0.07) , which was significantly higher than that of the Anti-NC group (0.37 ± 0.06) ($P < 0.05$). The cell proliferation activity of Anti-miR-183+si-PDCD4 group was (0.32 ± 0.04) , the number of clones was (286.47 ± 20.65) , and the level of PDCD4 protein was (0.45 ± 0.05) , all higher than those in the Anti-miR-183+si-NC group $[(0.21 \pm 0.03), (216.20 \pm 13.68), (0.86 \pm 0.09), \text{respectively}]$ ($P < 0.05$); the apoptosis rate of Anti-miR-183 group was $(10.79 \pm 1.28)\%$, and the level of cleaved-caspase-3 protein was (0.30 ± 0.03) , which were both lower than those in the Anti-miR-183+si-NC group $[(17.93 \pm 1.64)\%, (0.72 \pm 0.08), \text{respectively}]$ ($P < 0.05$). **Conclusion** Downregulation of miR-183 inhibits proliferation and induces apoptosis of nephroblastoma SK-NEP-1 cells by targeting PDCD4.

Key words: Wilms Tumor; Mir-183; Apoptosis; Caspase-3; PDCD4

肾母细胞瘤又称为Wilms瘤,其作为一种胚胎恶性肿瘤在儿童中最为常见^[1]。肾母细胞瘤的病因尚不清楚,其中基因表达改变是其发生的重要原因^[2]。微小RNA(microRNA, miRNA/miR)是一种非编码的RNA,参与细胞分化、胚胎发育和疾病发生^[3-4]。miR-183是近些年来发现的肿瘤促进因子,在肺癌、膀胱癌、乳腺癌等肿瘤组织中表达上调,人为的干扰miR-183表达可以抑制肿瘤细胞的恶性表型^[5-7]。现阶段对于miR-183在肾母细胞瘤细胞增殖和凋亡中的作用还不明确。本次实验于2018年12月至2019年7月采用细胞转染的方法下调肾母细胞瘤SK-NEP-1细胞中miR-183的表达水平,探讨下调miR-183对肾母细胞瘤细胞增殖和凋亡的影响及机制,以期靶向基因治疗肾母细胞瘤提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 肾母细胞瘤SK-NEP-1细胞购自上海哈灵生物科技有限公司;miR-183抑制剂(inhibitor)、

抑制剂阴性对照(inhibitor control)、miR-183模拟物(mimics)和模拟对照序列(mimics control)由吉满生物科技(上海)有限公司合成;噻唑蓝(MTT)和膜联蛋白V(Annexin V)-异硫氰酸荧光素(FITC)/碘化丙啶(PI)细胞凋亡试剂盒购自北京索莱宝生物科技有限公司;程序性细胞死亡4(programmed cell death 4, PDCD4)抗体购自美国Abcam;引物由南京金斯瑞合成;荧光素酶报告载体由西安淳风生物科技有限公司构建;活化胱天蛋白酶-3(cleaved-caspase-3)抗体购自美国Sigma-Aldrich;PDCD4小干扰RNA(si-PDCD4)、小干扰RNA阴性序列(si-NC)购自上海吉玛制药技术有限公司。

1.2 细胞转染 采用转染试剂Lipofectamine 2000分别将miR-183 inhibitor和inhibitor control转染到肾母细胞瘤SK-NEP-1细胞中,具体操作步骤同转染试剂说明书。设置转染miR-183 inhibitor和inhibitor control后的肾母细胞瘤SK-NEP-1细胞为Anti-miR-183组、Anti-NC组,设置没有转染的细胞为对

照组。

1.3 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 miR-183 表达 收集培养 48 h 以后的对照组、Anti-NC 组、Anti-miR-183 组细胞,然后在细胞内添加 Trizol 试剂,提取细胞中总 RNA。然后逆转录合成互补 DNA(cDNA)。PCR 引物序列如下,miR-183 正向引物:5'-AGUGAAUUCUACCAG UGC-CAUA 3',反向引物:5'-UAUGGCACUGGUAGA AUUCACU3';U6 正向引物:5'CTCGCTTCGGCAGC-CACA3',反向引物:5'AACGCTTCACGAATTGC-GT3'。使用 SYBR Green 进行 qRT-PCR,PCR 反应程序设置为:95 °C 反应 2 min;95 °C 反应 10 s;60 °C 反应 30 s,后两步设置 45 个循环,U6 为内参,结果用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算。

1.4 MTT 法测定细胞增殖能力 按照对照组、Anti-NC 组、Anti-miR-183 组细胞分组方法将细胞种植到 96 孔板中,37 °C 培养 2 d,加 5 g/L 的 MTT,培养 4 h。然后将上清吸弃,加二甲基亚砜,置于酶标仪上检测波长为 490 nm 的吸光度。

1.5 平板克隆实验测定细胞克隆能力 把对照组、Anti-NC 组、Anti-miR-183 组细胞接种到平皿内,培养 14 d,观察出现细胞克隆。以甲醇固定 10 min,使用 0.2% 的结晶紫染色,将平皿放在倒置显微镜下计数 ≥ 50 个细胞的克隆团数目,随机选择 5 个视野,计算均值。

1.6 流式细胞术测定细胞凋亡水平 收集培养 48 h 以后的对照组、Anti-NC 组、Anti-miR-183 组细胞,每组收集 10^6 个,将细胞悬浮在 300 μ L 的结合缓冲液中,将 Annexin V-FITC 和 PI 工作液添加到细胞中,再加入 200 μ L 的结合缓冲液,置于避光条件下结合反应 15 min,在 1 h 内使用流式细胞仪测定凋亡情况。

1.7 蛋白质印迹法(Western blotting)测定细胞中 cleaved-caspase-3 蛋白表达 收集培养 48 h 以后的对照组、Anti-NC 组、Anti-miR-183 组细胞,提取细胞总蛋白。将等体积 $2\times$ 上样缓冲液添加到蛋白样品中,煮沸 5 min。行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),每孔上样 30 μ g 蛋白,电泳 2 h 后关闭电源。使用转膜装置把凝胶上的蛋白电转移到 NC 膜上,转膜条件为 4 °C,转膜电流为 400 mA。NC 膜放在封闭液中结合 1 h,将 NC 膜放在 cleaved-caspase-3 抗体孵育液中,在 4 °C 过夜。NC 膜置于二抗反应液中结合 2 h。ECL 发光,扫描条带灰度值,内参设置为 β 肌动蛋白(β -actin)。

1.8 靶基因预测和鉴定 在线靶基因预测软件 TargetScan 发现 PDCD4 的 3' 非翻译区(3' UTR)端与

miR-183 有互补结合位点,构建含有 PDCD4 的 3' UTR 端的 PDCD4 野生型荧光素酶报告载体(WT),同时构建突变之后的突变型荧光素酶报告载体(MUT),利用 Lipofectamine 2000 把 WT 和 MUT 分别与 mimics control、miR-183 mimics 共转染到肾母细胞瘤 SK-NEP-1 细胞中,48 h 后,用荧光素酶活性测定试剂盒检测细胞荧光素酶活性变化。

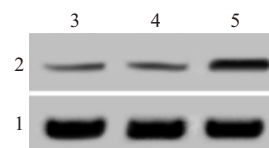
1.9 si-PDCD4 对下调 miR-183 的细胞增殖、克隆和凋亡影响 将 Anti-miR-183 与 si-NC、Anti-miR-183 与 si-PDCD4 共转染到肾母细胞瘤 SK-NEP-1 细胞中,记为 Anti-miR-183+si-NC 组和 Anti-miR-183+si-PDCD4 组,参照上述 MTT 法、平板克隆、流式细胞术以及蛋白质印迹法测定细胞增殖、克隆、凋亡和 cleaved-caspase-3、PDCD4 蛋白表达水平。

1.10 统计学方法 用 SPSS 21.0 软件分析数据,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用两独立样本 t 检验;多组间比较用单因素方差分析,多组间的两两比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-183 inhibitor 抑制肾母细胞瘤细胞中 miR-183 表达 对照组、Anti-NC 组和 Anti-miR-183 组肾母细胞瘤细胞中 miR-183 表达水平分别为 (1.00 ± 0.09) 、 (0.98 ± 0.11) 和 (0.32 ± 0.04) ($F = 61.82$, $P < 0.001$)。与 Anti-NC 组比较,Anti-miR-183 组肾母细胞瘤细胞中 miR-183 水平降低($P < 0.05$),对照组差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 下调 miR-183 对肾母细胞瘤细胞增殖、克隆和凋亡影响 与 Anti-NC 组比较,Anti-miR-183 组肾母细胞瘤细胞增殖、克隆能力下降($P < 0.05$),细胞凋亡率和 cleaved-caspase-3 蛋白水平升高($P < 0.05$);对照组各检测指标均差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 1,表 1。



注:1— β 肌动蛋白(β -actin);2—活化胱天蛋白酶-3(cleaved-caspase-3);3—对照组;4—Anti-NC 组;5—Anti-miR-183 组。

图1 蛋白质印迹法检测三组肾母细胞瘤细胞 cleaved-caspase-3 蛋白表达

2.3 miR-183 与 PDCD 靶向关系预测和鉴定 在线靶基因预测软件预测的 PDCD4 的 3' UTR 端与 miR-183 互补的结合位点见图 2。共转染 WT-PDCD4 与 miR-183 mimics 的肾母细胞瘤细胞荧光素酶活性为 (0.36 ± 0.04) ,显著低于共转染 WT-PDCD4 与 mimics control 的细胞 (1.00 ± 0.12) ($t = 9.47$,

表1 miR-183抑制剂(inhibitor)转染后肾母细胞瘤细胞增殖能力(吸光度)、克隆形成数目、凋亡率和活化胱天蛋白酶-3(cleaved-caspase-3)蛋白水平变化/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	吸光度	克隆形成数目/个	凋亡率/%	cleaved-caspase-3
对照组	3	0.39±0.05	314.58±23.85	2.45±0.21	0.28±0.03
Anti-NC组	3	0.40±0.03	312.87±22.28	2.36±0.32	0.27±0.04
Anti-miR-183组	3	0.20±0.02 ^①	213.69±20.94 ^①	16.47±1.58 ^①	0.69±0.09 ^①
F值		30.08	19.97	224.56	48.76
P值		0.001	0.002	<0.001	<0.001

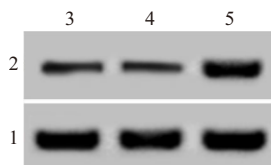
注:①与Anti-NC组比较, $P<0.05$ 。

Position 259-265 of PDCD4 3' UTR 5'...AAGCUACCUUUUGUAAGUGCCAU...
hsa-miR-183 3' GUCACUUAAGAUGGUCACGGUA

图2 在线靶基因预测软件TargetScan预测的程序性细胞死亡4(PDCD4)的3'非翻译区(3'UTR)端与miR-183互补的结合位点

$P<0.001$);共转染MUT-PDCD4与miR-183 mimics的肾母细胞瘤细胞荧光素酶活性为 0.98 ± 0.10 ,与共转染MUT-PDCD4与mimics control的细胞比较差异无统计学意义(1.00 ± 0.12) ($t=0.22$, $P=0.835$),说明miR-183靶向结合PDCD4。

2.4 下调miR-183对肾母细胞瘤细胞中PDCD4蛋白表达影响 对照组、Anti-NC组和Anti-miR-183组肾母细胞瘤细胞中PDCD4蛋白水平分别为(0.36 ± 0.04)、(0.37 ± 0.06)和(0.89 ± 0.07) ($F=81.89$, $P<0.001$)。与Anti-NC组比较, Anti-miR-183组肾母细胞瘤细胞中PDCD4蛋白水平升高($P<0.05$),对照组差异无统计学意义($P>0.05$)。见图3。



注:1—β肌动蛋白(β-actin);2—程序性细胞死亡4(PDCD4)蛋白;3—对照组;4—Anti-NC组;5—Anti-miR-183组。

图3 蛋白质印迹法检测三组肾母细胞瘤细胞PDCD4蛋白表达

2.5 si-PDCD4对下调miR-183的肾母细胞瘤细胞增殖、克隆和凋亡的逆转作用 与Anti-miR-183+si-NC组比较, Anti-miR-183+si-PDCD4组肾母细胞瘤细胞增殖和克隆能力升高,细胞凋亡减少,细胞中cleaved-caspase-3、PDCD4蛋白表达水平下降(均 $P<0.05$),见表2。

表2 程序性细胞死亡4(PDCD4)小干扰RNA(si-PDCD4)和miR-183抑制剂(inhibitor)共转染后肾母细胞瘤细胞增殖能力(吸光度)、克隆形成数目、凋亡率和活化胱天蛋白酶-3(cleaved-caspase-3)、PDCD4蛋白水平变化/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	吸光度	克隆形成数目/个	凋亡率/%	cleaved-caspase-3	PDCD4
Anti-miR-183+si-NC组	3	0.21±0.03	216.20±13.68	17.93±1.64	0.72±0.08	0.86±0.09
Anti-miR-183+si-PDCD4组	3	0.32±0.04	286.47±20.65	10.79±1.28	0.30±0.03	0.45±0.05
t值		3.81	4.91	5.95	8.51	6.90
P值		0.019	0.008	0.004	<0.001	0.002

3 讨论

肿瘤发生与肿瘤细胞失控性生长有关,是一个多步骤、复杂过程,在肿瘤进展中,癌基因表达上调和抑癌基因表达下调均可以诱导肿瘤恶性进展^[8]。miRNA是广泛存在于真核生物体内的单链RNA,其可以通过影响基因转录后表达而参与细胞的生长过程^[9]。多项研究显示,miRNA与肿瘤的进展有关,参与调控肿瘤生长、凋亡等生物学特性发挥过程,在肿瘤进展中发挥类似癌基因或抑癌基因的作用^[10-11]。miR-183在进化上高度保守,可以通过影响肿瘤相关基因的表达调控肿瘤的发展^[12]。在肺癌中发现miR-183可以作为一种肿瘤促进因子诱导肺癌的生长^[13]。还有研究报道,在肝癌、前列腺癌等肿瘤组织中发现miR-183的促肿瘤生长作用,其被认为是一种肿瘤促进因子^[14-15]。本次实验表明,下调miR-183后的肾母细胞瘤细胞增殖和克隆能力下降,提示下调miR-183具有抑制肾母细胞瘤细胞恶性生长的作用。

本研究结果还显示,下调miR-183后的肾母细胞瘤细胞凋亡水平升高,细胞中cleaved-caspase-3蛋白水平也升高。胱天蛋白酶(caspase)蛋白家族含有十几个家族成员,主要存在于细胞质中,是目前发现的与细胞凋亡有关的调控因子^[16]。caspase蛋白家族成员在凋亡反应中发挥起始因子、执行因子等不同作用,并且正常情况下以酶原形式存在的caspase蛋白家族成员不具备活性,只有被激活后才可以诱导细胞凋亡发生^[17]。cleaved-caspase-3是胱

天蛋白酶-3(caspase-3)的活化形式,caspase-3是凋亡反应的执行因子,位于凋亡级联反应的下游,其活化后是细胞凋亡进入不可逆阶段的标志^[18]。本次结果显示,下调 miR-183 促进肾母细胞瘤细胞中 cleaved-caspase-3 蛋白表达,进一步说明下调 miR-183 诱导肾母细胞瘤细胞凋亡。

miRNA 具有多种生物学作用,其生物学作用的发挥与调控细胞内靶基因的表达有关^[19]。研究表明,miR-183 作用机制与靶向调控多个靶基因有关,并且其在不同的病理过程中调控的靶基因不同^[20]。本次实验显示,PDCD4 是 miR-183 的靶基因,miR-183 作用机制在肾母细胞瘤细胞中的作用机制可能与 PDCD4 有关。PDCD4 是一个与细胞凋亡有关的肿瘤抑制因子,在肿瘤组织中表达下调,上调 PDCD4 可以诱导肿瘤细胞凋亡和增殖抑制^[21]。本研究证实,下调 PDCD4 可以逆转下调 miR-183 对肾母细胞瘤细胞增殖抑制和凋亡促进作用,提示下调 miR-183 通过靶向调控 PDCD4 的表达影响肾母细胞瘤细胞增殖和凋亡。

总之,下调 miR-183 可以阻碍肾母细胞瘤细胞恶性生长,促进细胞凋亡,并且其作用机制与靶向调控 PDCD4 的表达有关,靶向抑制 miR-183 可能是肾母细胞瘤治疗的途径,miR-183 在肾母细胞瘤中可能发挥促进作用。在以后的实验中会在多株肾母细胞瘤细胞中进行验证,并对其具体的调控机制进行探讨。

参考文献

- [1] SHI HB, YU JP, LI J. Nephroblastoma overexpressed gene expression and its prognostic implications of clinical outcomes in renal cell carcinoma patients[J]. *Cancer Biomark*, 2017, 20(3): 241-246.
- [2] TANAKA N, IZAWA T, YAMATE J, et al. Spontaneous nephroblastoma with striated muscle differentiation in an F344 rat[J]. *J Toxicol Pathol*, 2017, 30(3):231-234.
- [3] WANG WY, WANG J, YAN ML, et al. MiRNA-92a protects pancreatic B-cell function by targeting KLF2 in diabetes mellitus[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 500(3):577-582.
- [4] ZAPOROZHCHENKO I A, BRYZGUNOVA O E, LEKCHNOV E A, et al. Representation analysis of miRNA in urine microvesicles and cell-free urine in prostate diseases[J]. *Biochem Suppl*, 2018, 12(2):156-163.
- [5] HE RQ, GAO L, MA J, et al. Oncogenic role of miR-183-5p in lung adenocarcinoma: a comprehensive study of qPCR, in vitro experiments and bioinformatic analysis[J]. *Oncol Rep*, 2018, 40(1):83-100.
- [6] GAO JM, HUANG LZ, HUANG ZG, et al. Clinical value and potential pathways of miR-183-5p in bladder cancer: a study based on miRNA-seq data and bioinformatics analysis[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(4):5056-5070.
- [7] MACEDO T, SILVA-OLIVEIRA RJ, VAO S, et al. Overexpression of mir-183 and mir-494 promotes proliferation and migration in human breast cancer cell lines[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(1): 1054-1060.
- [8] YIN W, SHI L, MAO Y. MiR-194 regulates nasopharyngeal carcinoma progression by modulating MAP3K3 expression[J]. *FEBS Open Bio*, 2019, 9(1):43-52.
- [9] PENG QP, DU DB, MING Q, et al. MicroRNA 494 increases chemosensitivity to doxorubicin in gastric cancer cells by targeting phosphodiesterases 4D[J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2018, 64(15):62-66.
- [10] LI C, ZENG X, LIU Z, et al. BDNF VAL66MET polymorphism elevates the risk of bladder cancer via miRNA-146b in micro-vehicles[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 45(1):366-377.
- [11] LU J, MU XP, YIN QN, et al. miR-106a contributes to prostate carcinoma progression through PTEN[J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(1):1327-1332.
- [12] 王赛, 曾亚. miR-183 在结直肠癌组织中的表达及其临床意义[J]. *医学临床研究*, 2017, 34(7):1414-1415.
- [13] KUNDU ST, BYERS LA, PENG D, et al. The miR-200 family and the miR-183~96~182 cluster target Foxf2 to inhibit invasion and metastasis in lung cancers[J]. *Oncogene*, 2016, 35(2): 173-186.
- [14] 赵涛, 刘家骥. miR-183 通过靶定 EPHA4 调控老年前列腺癌细胞的转移[J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38(4):887-890.
- [15] 张自立, 石文霞, 李霖, 等. 肝癌血清中 miRNA-183 的表达及临床意义[J]. *天津医科大学学报*, 2017, 23(6):519-522.
- [16] PU X, STORR SJ, ZHANG YM, et al. Caspase-3 and caspase-8 expression in breast cancer: caspase-3 is associated with survival[J]. *Apoptosis*, 2017, 22(3):357-368.
- [17] ZHANG Q, BAO J, YANG JH. Genistein-triggered anticancer activity against liver cancer cell line HepG2 involves ROS generation, mitochondrial apoptosis, G2/M cell cycle arrest and inhibition of cell migration[J]. *Arch Med Sci*, 2019, 15(4): 1001-1009.
- [18] HONG H, AN JC, DE LA CRUZ JF, et al. Cnidium officinale makino extract induces apoptosis through activation of caspase-3 and p53 in human liver cancer HepG2 cells[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(4):3191-3197.
- [19] LI CM, LYU JX, MENG QH. MiR-93 promotes tumorigenesis and metastasis of non-small cell lung cancer cells by activating the PI3K/Akt pathway via inhibition of LKB1/PTEN/CDKN1A[J]. *J Cancer*, 2017, 8(5):870-879.
- [20] SARVER AL, LI L, SUBRAMANIAN S. MicroRNA miR-183 functions as an oncogene by targeting the transcription factor EGR1 and promoting tumor cell migration[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(23):9570-9580.
- [21] YU G, JIA BL, CHENG YS, et al. MicroRNA-429 sensitizes pancreatic cancer cells to gemcitabine through regulation of PDCD4[J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(11):5048-5055.

(收稿日期:2019-10-18,修回日期:2019-12-13)