

MicroRNA-145 通过 ADAM28 抑制人肾癌细胞 A-498 上皮-间充质转化功能*

梁莹¹, 李剑波², 邵欣宁¹, 林柳¹, 雷鸣^{1△}

(¹广州市第八人民医院肾内科, 广东 广州 510060; ²中山大学附属第一医院肾内科, 广东 广州 510080)

[摘要] 目的: 探讨微小 RNA(miR-145)对人肾癌细胞 A-498 上皮-间充质转化(EMT)功能的影响及其相关机制。方法: 将 A-498 肾癌细胞株分别转染 miR-145 模拟物(M145)和模拟物阴性对照(MNC), 分别作为 M145 组和 MNC 组, 并设立空白对照(MC)组, 采用 RT-qPCR 法检测各组细胞 miR-145 水平。Transwell 实验检测 3 组细胞侵袭能力的变化。Western blot 法检测 3 组细胞波形蛋白(vimentin)、E-cadherin 和 ADAM28 表达水平。应用生物信息学方法预测 miR-145 的靶基因。采用 Western blot 法检测 ADAM28 过表达对 miR-145 抑制 EMT 的拮抗作用。双萤光素酶报告基因实验验证 miR-145 与 ADAM28 的关系。结果: 与 MC 组相比, M145 组 miR-145 的表达水平显著上调($P < 0.05$)。M145 组侵袭细胞数量显著低于 MC 组($P < 0.05$)。M145 组细胞 vimentin 蛋白表达量显著降低($P < 0.05$), E-cadherin 蛋白表达量显著升高($P < 0.05$), ADAM28 蛋白表达量显著降低($P < 0.05$)。ADAM28 过表达 M145 组肾癌细胞中 vimentin 蛋白表达量显著升高($P < 0.05$), E-cadherin 蛋白表达量显著降低($P < 0.05$)。双萤光素酶报告基因实验结果显示 ADAM28 为 miR-145 的下游靶基因。结论: miR-145 可能通过降低下游靶基因 ADAM28 水平影响 EMT 相关蛋白表达, 从而抑制人肾癌细胞 A-498 的 EMT 过程。

[关键词] 肾癌; 微小 RNA-145; ADAM28 蛋白; 上皮-间充质转化

[中图分类号] R392.12; R737.11 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.05.004

MicroRNA-145 inhibits epithelial-mesenchymal transition in human renal cancer A-498 cells by ADAM28

LIANG Ying¹, LI Jian-bo², SHAO Xin-ning¹, LIN Liu¹, LEI Ming¹

(¹Department of Nephrology, Guangzhou Eighth People's Hospital, Guangzhou 510060, China; ²Department of Nephrology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China. E-mail: gz8hlmsn@126.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the inhibitory effect of microRNA-145 (miR-145) on epithelial-mesenchymal transition (EMT) in renal cancer A-498 cells. **METHODS:** The A-498 cells were transfected with miR-145 mimics (M145) and mimic negative control(MNC), which served as M145 group and MNC group, respectively. Mock control (MC) group was set up using untreated A-498 cells. The expression level of miR-145 in each group was detected by RT-qPCR. Transwell assay was used to detect the invasion ability of the cells. The protein expression of vimentin, E-cadherin and ADAM28 was determined by Western blot. Bioinformatic method was used to predict the target genes of miR-145. Antagonistic effect of ADAM28 over-expression on the inhibition of EMT by miR-145 was detected by Western blot. The relationship between miR-145 and ADAM28 was analyzed by dual-luciferase reporter assay. **RESULTS:** The expression level of miR-145 in M145 group was significantly up-regulated than that in MC group ($P < 0.05$). The number of invasive cells in M145 group was 12.78 ± 3.37 , which was significantly lower than that in MC group ($P < 0.05$). ADAM28 may be the target gene of miR-145. Compared with MC group, the protein expression of vimentin and ADAM28 in M145 group was significantly decreased ($P < 0.05$), while the protein expression of E-cadherin was significantly increased ($P < 0.05$). After ADAM28 over-expression, the protein expression of vimentin in the A-498 cells of M145 group was significantly increased ($P < 0.05$), and the protein expression of E-cadherin was significantly decreased ($P < 0.05$). The results of dual-luciferase reporter assay showed that ADAM28 was a downstream target gene of miR-145. **CONCLUSION:** miR-145 may inhibit the expression of EMT-related proteins through the downstream target gene ADAM28 and inhibit the EMT process of renal

[收稿日期] 2018-09-18 [修回日期] 2019-01-28

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81572522)

△通讯作者 Tel: 020-83838688; E-mail: gz8hlmsn@126.com

cancer A-498 cells.

[KEY WORDS] Renal cancer; MicroRNA-145; ADAM28 protein; Epithelial-mesenchymal transition

侵袭和转移是影响肾癌患者整体预后的重要因素。尽管目前肾癌包括手术、放化疗在内的治疗方式和效果长足进展,但肾癌患者的总体预后并不能令人满意。超过30%的肾癌患者会发生转移^[1]。侵袭转移也是导致肾癌进展、复发和致死的主要原因,严重影响患者的疗效和生存质量。因此,深入研究肾癌转移的发生机制,寻找可以有效干预肾癌转移的分子靶点,是提高肾癌患者疗效和改善其预后的有效途径^[2-3]。学术界普遍认为,上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程在肾癌等恶性肿瘤的侵袭转移中具有重要作用,因此探寻其中与肾癌转移相关的分子,有助于丰富对于肾癌转移机制的认识,开发针对肾癌 EMT 的有效治疗靶点,对实现抑制肾癌的侵袭转移具有科学意义^[4]。近年来研究表明,微小 RNA (microRNA, miR)-145 与多种恶性肿瘤的发生发展有密切关系,可能通过多种分子生物途径发挥抑癌作用有望成为肾癌的基因治疗靶点^[5]。然而,在对肾癌进行 miR-145 靶向基因治疗后,对肾癌细胞上皮-间充质转化和侵袭转移的影响及其机制尚不明确^[6]。本研究对 miR-145 的靶基因进行生物信息学预测后提示,与多种恶性肿瘤生物学行为相关的解整联蛋白-金属蛋白酶 28 (a disintegrin and metalloproteinase 28, ADAM28) 可能是其在细胞中的作用靶蛋白^[7]。本项工作采用 miR-145 模拟物 (miR-145 mimics) 转染人肾癌细胞系 A-498 细胞,观察其对肾癌细胞上皮-间质转化过程的影响,进而通过研究其对 EMT 相关功能蛋白及 ADAM28 蛋白表达水平的影响,进一步明确其分子生物学机制。

材 料 和 方 法

1 材料

miR-145 mimics 及其阴性对照 (mimic negative control, MNC)、miR-145 及内参照 RNU6 的 PCR 引物、双荧光素酶检验试剂盒、野生型的 WT-ADAM28 psiCHECK™-2 载体及 3' UTR 定点突变后的 MT-ADAM28 psiCHECK™-2 载体和 3' UTR 定点突变的 ADAM28 过表达质粒载体购自广州爱科生物技术有限公司。DMEM 高糖培养液和胎牛血清购自 GIBCO; 转染试剂脂质体 2000 购自 Invitrogen; Transwell 小室购自 NUNC; real-time PCR 和逆转录-聚合酶链反应试剂盒购自 TaKaRa。兔抗人 ADAM28、兔抗人波形蛋白 (vimentin)、兔抗人 E-钙黏蛋白 (cadherin) 和

兔抗人 β -肌动蛋白 (actin) 抗体购自 Abcam。肾癌细胞株 A-498 购自美国模式培养物集存库 (ATCC® Number: HTB-44™)。

2 方法

2.1 miRNA 转染和 RT-qPCR 检测 以含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液常规培养 A-498 肾癌细胞株。按照转染试剂脂质体 2000 试剂说明书,在细胞融合度约 60% 时以 miRNA mimics 终浓度为 65 nmol/L 转染 miR-145 mimics 和 MNC, 分别作为 M145 和 MNC 组转染 48 h; 以未转染 A-498 细胞作为空白对照 (mock control, MC) 组。TRIzol 法提取各组细胞总 RNA, 逆转录合成 cDNA。以 U6 snRNA 为内参照, 进行 RT-qPCR 检测。miR-145 的正向引物序列为 5'-ACACTCCAGCTCCATGGGGTTTTCCAGGA-3', 反向引物序列为 5'-CTCAACTGAGTCGGTGGGCAGTTGAGAGGGATTTC-3'; U6 的正向引物序列为 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3', 反向引物序列为 5'-AACGCTTACGAATTTGCCGT-3'。PCR 条件为: 92 °C 35 s; 92 °C 5 s, 57 °C 38 s, 52 个循环。循环延伸末端收集荧光信号, 所得数据用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行分析计算。

2.2 Transwell 法检测细胞侵袭能力 将 Matrigel 稀释后, 每个 Transwell 小室加入 45 μ L, 37 °C 凝固 2 h。分组转染后, 各组细胞分别取对数期 0.8×10^5 个细胞 160 μ L 无血清培养液重悬后加入 Transwell 小室上室。Transwell 下室加入 500 μ L 含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液。细胞培养箱 37 °C 常规培养 48 h, 清除上室底膜未穿膜上室细胞, 甲醇固定穿膜上室细胞 20 min, PBS 冲洗。1% 结晶紫染色 30 min, PBS 冲洗。显微镜下观察上室底膜, 计数穿过小孔细胞^[8]。

2.3 miR-145 靶基因预测 运用生物信息学方法明确 miRBase 数据库中搜索 hsa-miR-145 基因的序列, 进而分析 miR-145 序列的特征并预测其靶基因。

2.4 Western blot 法检测细胞蛋白表达的变化 肾癌细胞分组转染后 48 h, 按照既往报道方法收集细胞, 提取总蛋白, 进行 Western blot 检测, 分析 ADAM28、波形蛋白、E-钙黏蛋白和内参照 β -actin 蛋白的表达^[8]。

2.5 ADAM28 过表达对 miR-145 抑制 EMT 的拮抗作用 采用 ADAM28 过表达质粒转染 M145 组细胞系, 并通过 Western blot 检测 ADAM28 过表达后 M145 组 A-498 细胞中 ADAM28 和 EMT 相关蛋白的

表达情况。

2.6 双荧光素酶报告基因实验检测 miR-145 与 ADAM28 的关系 采用野生型的 ADAM28 psiCHECK™-2 载体及定点突变后的 ADAM28 psiCHECK™-2 载体,分别和 miR-145 mimics 一起通过脂质体共转染,转染 48 h 后检测荧光素酶相对活性。

3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件进行分析。实验数据用均数 ± 标准差 (mean ± SD) 表示。多组间比较用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 两组之间比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 miR-145 mimics 转染对 A-498 细胞 miR-145 水平的影响

转染 A-498 细胞 48 h 后, RT-qPCR 检测各组细胞中 miR-145 的表达水平。结果显示, 与 MC 组相比, M145 组 miR-145 的表达水平显著上调 ($P < 0.05$), 而 MNC 组的 miR-145 表达水平与 MC 组差异没有统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 1。

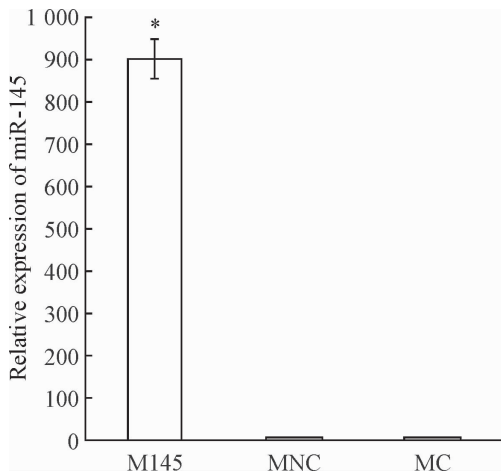


Figure 1. RT-qPCR was used to detect the expression of miR-145 in renal carcinoma A-498 cells. Mean ± SD. $n = 3$. * $P < 0.05$ vs MC group.

图 1 RT-qPCR 检测各组 A-498 肾癌细胞中 miR-145 的表达水平

2 miR-145 对 A-498 细胞侵袭能力的影响

Transwell 实验中, 经过 48 h 培养, 观察受到染色的穿膜细胞数量。结果显示, M145 组侵袭细胞数量显著低于 MC 组 ($P < 0.05$), 而 MNC 组的细胞数量与 MC 组之间的差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 2。

3 miR-145 对 A-498 细胞 EMT 相关功能蛋白表达的影响

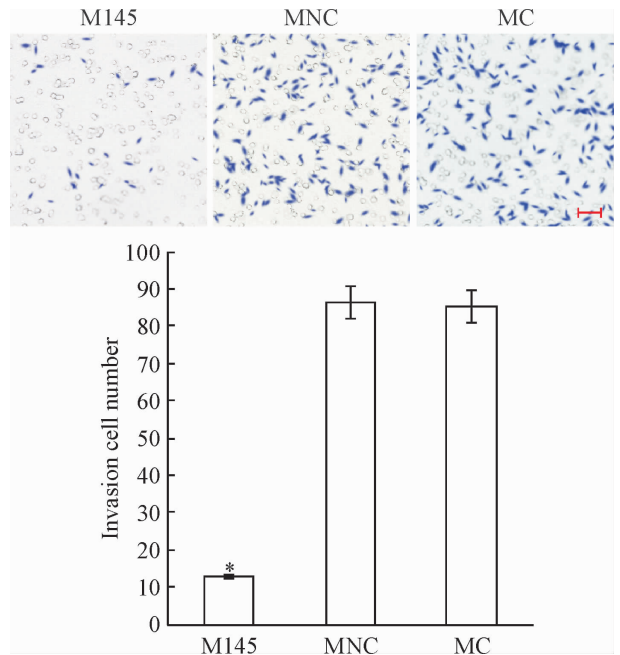


Figure 2. The invasion ability of A-498 cells in each group was detected by Transwell assay. The scale bar = 50 μm . Mean ± SD. $n = 3$. * $P < 0.05$ vs MC group.

图 2 Transwell 实验比较各组 A-498 细胞侵袭能力

Western blot 实验显示, 与 MC 组相比, M145 组 vimentin 蛋白表达量显著降低 ($P < 0.05$), E-cadherin 蛋白表达量显著升高 ($P < 0.05$), 而 MNC 组与对照组之间的蛋白表达无显著差异 ($P > 0.05$), 见图 3。

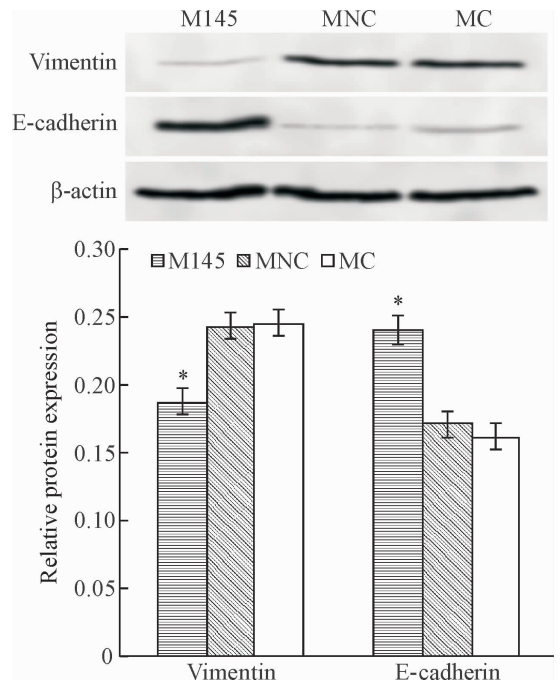


Figure 3. Western blot assay was used to detect the expression level of EMT-related proteins in A-498 cells of each group. Mean ± SD. $n = 3$. * $P < 0.05$ vs MC group.

图 3 Western blot 实验检测各组 A-498 细胞 EMT 相关蛋白表达水平

4 miR-145 靶基因的预测

miRBase 生物信息学预测结果表明,miR-145 与

ADAM28 的 3'-UTR 部分互补,ADAM28 可能是 miR-145 的靶基因,见图 4。



Figure 4. Bioinformatic prediction results of miR-145 target genes from bioinformatics prediction.

图 4 miR-145 靶基因生物信息学预测结果

5 miR-145 对 A-498 细胞 ADAM28 蛋白表达的影响

Western blot 实验显示,与 MC 组相比,M145 组 ADAM28 蛋白表达量显著降低 ($P < 0.05$),ADAM28 蛋白表达量的 Western blot 结果与 miR-145 的表达水平表现出负相关关系。而 MNC 组与 MC 组之间的 ADAM28 蛋白表达无显著差异 ($P > 0.05$),见图 5。

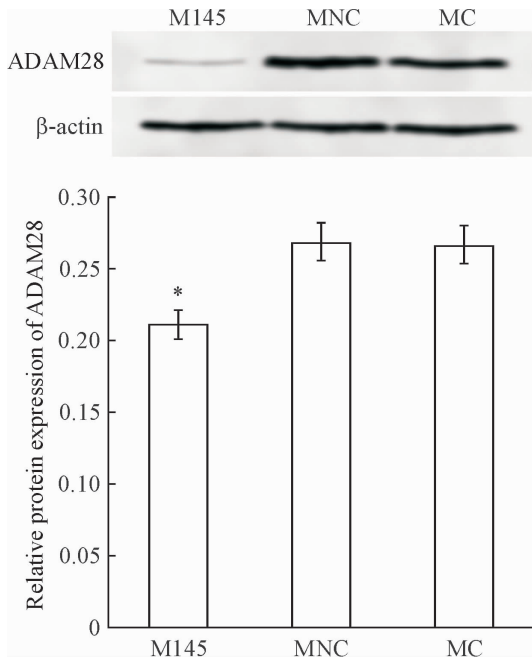


Figure 5. Western blot assay was used to detect the expression level of ADAM28 protein in A-498 cells of each group. Mean \pm SD. $n = 3$. * $P < 0.05$ vs MC group.

图 5 Western blot 实验检测各组 A-498 细胞 ADAM28 蛋白表达水平

6 ADAM28 过表达对 miR-145 抑制肾癌细胞 EMT 的拮抗效果

Western blot 实验检测到,相比单纯 miR-145 mimic 转染组细胞,采用 ADAM28 过表达质粒联合转染后的 M145 组细胞 ADAM28 表达量升高 ($P < 0.05$),同时,细胞中 vimentin 蛋白表达量显著升高 ($P < 0.05$),E-cadherin 蛋白表达量显著降低 ($P <$

0.05),见图 6。

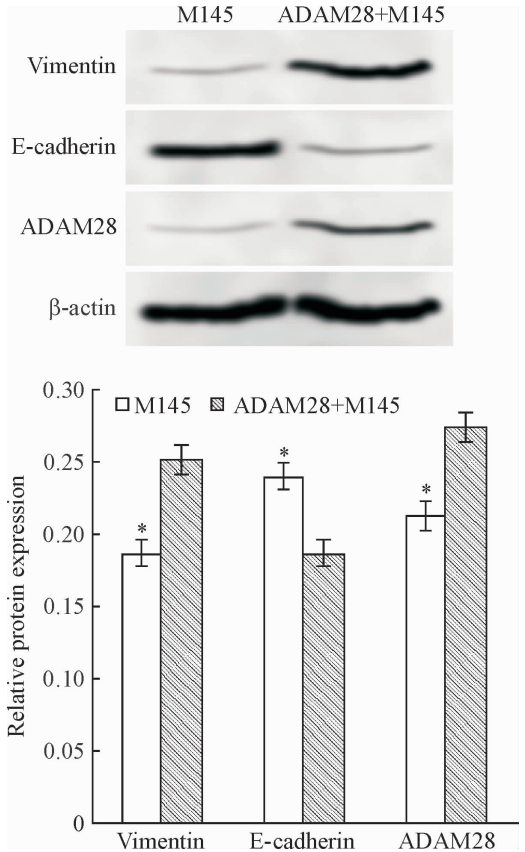


Figure 6. The effect of miR-145 on the expression of EMT-related proteins in A-498 cells with or without ADAM28 over-expression. Mean \pm SD. $n = 3$. * $P < 0.05$ vs M145 group.

图 6 ADAM28 过表达拮抗 miR-145 对 A-498 细胞 EMT 相关功能蛋白表达的影响

7 miR-145 与 ADAM28 相互作用关系的双萤光素酶报告基因实验检测

双萤光素酶报告基因实验结果显示 miR-145 能显著抑制野生型 WT-ADAM28 psiCHECKTM-2 载体的发光强度 ($P < 0.05$),而无法抑制 3' UTR 定点突变型 MT-ADAM28 psiCHECKTM-2 载体的发光强度 ($P > 0.05$),见图 7,说明 ADAM28 为 miR-145 的下游靶基因。

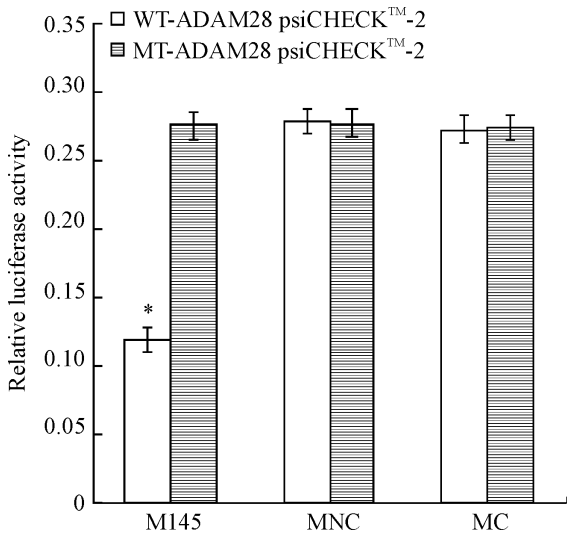


Figure 7. The relative luciferase activity of ADAM28. Mean \pm SD. $n=3$. * $P < 0.05$ vs MC group.

图7 ADAM28的荧光素酶活性比较

讨 论

miR-145的基因定位于染色体5q32,与miR-143组成一个转录单位,生成同一个前体,经过内切酶剪切后形成^[9]。miR-145在人体内子宫、卵巢、睾丸、前列腺、脾脏和心脏等组织器官中高表达,而在宫颈癌、乳腺癌、前列腺癌、肺癌、肝癌、膀胱癌、卵巢癌和脑垂体瘤等低表达^[10]。所以,miR-145有可能在肾癌发生、发展中扮演抑癌基因的作用^[6]。本研究尝试采用miR-145 mimics实现对人肾癌细胞A-498中miR-145的过表达,进而检测到对肾癌细胞侵袭能力的抑制,说明miR-145高表达具有对人肾癌细胞A-498侵袭能力的抑制效果。

既往研究表明,miR-145与多种恶性肿瘤的上皮-间质转化过程密切相关。EMT在肿瘤迁移和侵袭的发生这一多因素多步骤的动态过程中起重要作用,是肿瘤侵袭转移的重要分子生物学机制^[11]。EMT是胚胎发育及肿瘤侵袭转移中,上皮细胞通过特定程序转化为具有间质表型细胞的生物学过程,主要表现为细胞黏附分子(如上皮标志物E-cadherin)表达减少及间充质标志物(如vimentin)表达增多等。为明确miR-145抑制肾癌细胞迁移能力和侵袭能力是否是通过A-498细胞的EMT调控实现的,本研究对EMT相关功能蛋白进行了检测,结果表明,miR-145过表达后,vimentin蛋白表达量显著降低,E-cadherin蛋白表达量显著升高,提示miR-145实现了对EMT过程的抑制,进而进行了对肾癌细胞迁移能力和侵袭能力的抑制。

MicroRNA的主要作用机制是与靶蛋白mRNA的3'-UTR形成互补配对,进而使其降解,抑制靶蛋白的表达。对靶基因正确进行准确的预测与鉴定,是研究microRNA生物学功能的基础和关键。对目的microRNA进行生物信息学分析,能够迅速预测出可能的靶基因作用位点,但是根据不同原则寻找靶基因,均可能出现假阳性和假阴性的预测结果。所以生物信息学软件预测靶基因后,可以进一步采用生物学实验方法进行验证,以进一步研究其生物学功能^[12]。本研究的生物信息学预测结果提示,ADAM28为miR-145的潜在靶基因,且其热稳定型和基因保守性较高。然而,单纯从miR-145和下游靶基因基因序列上的相互作用预测模型的数据库中并不能确切推断其具体的生物学功能,及具体起效的靶蛋白。所以,在预测靶蛋白之后,必须对miR-145和靶基因的调控机制进行基因表达层面和功能调控层面的验证。如果能够通过生物学实验证实两者的直接调节关系,将有助深入了解miR-145在肾癌细胞的增殖、分化和凋亡以及与肾癌的发生、发展机制。ADAM28是ADAM家族的重要成员之一,由多个结构域组成,包括前肽、金属蛋白酶、表皮生长因子样结构域、跨膜结构域和细胞质尾结构域等。与其它ADAM相比,ADAM28是通过在细胞表面形成成熟的跨膜结构域后,通过特异性自催化过程激活的^[13]。报道显示,ADAM28参与包括肺癌、乳腺癌、膀胱癌和白血病在内的很多恶性肿瘤的生长和转移,在恶性肿瘤细胞中,对其进行靶向治疗可能具有重要临床意义^[7,13]。本研究观察到,对miR-145作用于肾癌细胞后,抑制ADAM28蛋白表达的效果显著,细胞中的ADAM28蛋白表达水平显著降低,这个结果促使我们对ADAM28是否是miR-145的靶蛋白进行进一步的深入探索。

我们构建了3'-UTR突变的ADAM28过表达质粒,使其转染高表达miR-145的A-498细胞。伴随ADAM28表达量的升高,细胞中vimentin蛋白表达量显著升高,E-cadherin蛋白表达量显著降低,说明3'-UTR突变后引起的ADAM28过表达可以实现对miR-145抑制EMT的拮抗作用。我们进而通过双荧光素酶检验结果对两者的直接相关关系进行探索,观察到miR-145只能抑制野生型WT-ADAM28 psiCHECK™-2载体的发光强度,而无法抑制3'UTR定点突变后的MT-ADAM28-psiCHECK™-2载体的发光强度,说明ADAM28为miR-145直接的下游靶基因。

综上所述,miR-145 可能通过降低下游靶基因 *ADAM28* 水平影响 EMT 相关蛋白表达,进而抑制人肾癌细胞 A-498 的 EMT 功能,有可能成为肾癌基因治疗的良好靶点。

[参 考 文 献]

- [1] 张旖骁, 吴 斌. miR-497 与肾癌预后的关系及其对肾癌 786-0 细胞增殖、凋亡和侵袭的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2016, 32(11):1979-1983.
- [2] Chen B, Jiao Z, Yin X, et al. Novel insights into biomarkers associated with renal cell carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(1):83-90.
- [3] Johnson BA, Sorokin I, Cadeddu JA. Ten-year outcomes of renal tumor radiofrequency ablation[J]. *J Urol*, 2019, 201(2):251-258.
- [4] Singla M, Bhattacharyya S. Autophagy as a potential therapeutic target during epithelial to mesenchymal transition in renal cell carcinoma: an *in vitro* study [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 94(2017):332-340.
- [5] Chen Y, Sun Y, Rao Q, et al. Androgen receptor (AR) suppresses miRNA-145 to promote renal cell carcinoma (RCC) progression independent of VHL status[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(31):31203-31215.
- [6] Papadopoulos EI, Petraki C, Gregorakis A, et al. Clinical evaluation of microRNA-145 expression in renal cell carcinoma: a promising molecular marker for discriminating and staging the clear cell histological subtype[J]. *Biol Chem*, 2016, 397(6):529-539.
- [7] Mochizuki S, Soejima K, Shimoda M, et al. Effect of *ADAM28* on carcinoma cell metastasis by cleavage of von Willebrand factor [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2012, 104(12):906-922.
- [8] Wang J, Ou J, Guo Y, et al. *TBLR1* is a novel prognostic marker and promotes epithelial-mesenchymal transition in cervical cancer[J]. *Br J Cancer*, 2014, 111(1):112-124.
- [9] Zhu H, Dougherty U, Robinson V, et al. *EGFR* signals downregulate tumor suppressors miR-143 and miR-145 in Western diet-promoted murine colon cancer: role of *G₁* regulators[J]. *Mol Cancer Res*, 2011, 9(7):960-975.
- [10] 徐 杨, 赵丽君, 王 春. miR-145 过表达对宫颈癌细胞辐射敏感性的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(4):630-636.
- [11] Zhou P, Sun L, Liu D, et al. Long non-coding RNA lincRNA-ROR promotes the progression of colon cancer and holds prognostic value by associating with miR-145 [J]. *Pathol Oncol Res*, 2016, 22(4):733-740.
- [12] Wang W, Ji G, Xiao X, et al. Epigenetically regulated miR-145 suppresses colon cancer invasion and metastasis by targeting *LASP1* [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(42):68674-68687.
- [13] Nowakowska-Zajdel E, Mazurek U, Wierzoń J, et al. Expression of *ADAM28* and *IGFBP-3* genes in patients with colorectal cancer: a preliminary report [J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2013, 26(1):223-228.

(责任编辑: 林白霜, 罗 森)