

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.03.005

· 基础研究 ·

miR-19a-3p 靶向细胞黏附分子 2 阻断 AKT 通路抑制肾癌细胞 786-O 的增殖和迁移

杨静¹, 卢国元¹, 沈蕾¹, 沙文刚¹, 沈霞红¹, 杨爱祥² [1. 苏州大学附属第一医院 肾内科, 江苏 苏州 215007; 2. 南京医科大学附属苏州医院(苏州市立医院北区)重症监护病室, 江苏 苏州 215008]

[摘要] **目的:** 探讨肾癌组织高表达的 miR-19a-3p 靶向调控细胞黏附分子 2 (cell adhesion molecule 2, CADM2) 并通过 AKT 信号通路影响肾癌细胞增殖和迁移的机制。**方法:** 收集 2012 年 4 月至 2017 年 11 月苏州大学附属第一医院肾内科收治的 42 例资料完整的肾癌患者手术切除的肾癌组织和癌旁组织标本。采用 qPCR 检测肾癌组织和 786-O 等 4 种肾癌细胞系中 miR-19a-3p 的表达水平, CCK-8、Transwell 和免疫荧光法检测 miR-19a-3p 敲减对肾癌 786-O 细胞增殖、侵袭和上皮间质转化的影响, 双荧光素酶报告基因验证 miR-19a-3p 与 CADM2 的靶向关系。采用 Wb 检测 miR-19a-3p 通过 CADM2 对 AKT 信号通路的调控作用。**结果:** miR-19a-3p 在肾癌组织及细胞系中均高表达 (均 $P < 0.01$)。敲减 miR-19a-3p 可显著抑制 786-O 细胞增殖、迁移和上皮间质转化, 且 miR-19a-3p 靶向作用 CADM2 并下调其表达水平 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。敲减 miR-19a-3p 通过靶向上调 CADM2 并阻断 AKT 信号通路进而显著抑制 786-O 细胞增殖、迁移和上皮间质转化 (均 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 从而缓解肾癌发生发展。**结论:** 肾癌组织中 miR-19a-3p 高表达, 敲减 miR-19a-3p 可显著抑制肾癌细胞的增殖、迁移和上皮间质转化, 其机制可能是通过 miR-19a-3p/CADM2/AKT 分子轴起作用。

[关键词] 肾癌; 786-O 细胞; miR-19a-3p; 细胞黏附分子 2; 上皮间质转化

[中图分类号] R737.11; R392.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)03-0280-07

miR-19a-3p targets cell adhesion molecule 2 to inhibit proliferation and metastasis of renal carcinoma 7867-O cells via blocking AKT pathway

YANG Jing¹, LU Guoyuan¹, SHEN Lei¹, SHA Wengang¹, SHEN Xiahong¹, YANG Aixiang² (1. Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215007, Jiangsu, China; 2. Intensive Care Unit, Suzhou Hospital Affiliated to Nanjing Medical University [North District of Suzhou State Hospital], Suzhou 215008, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism of miR-19a-3p regulating cell adhesion molecule 2 (CADM2) to inhibit the proliferation and metastasis of renal carcinoma cells via the AKT signaling pathway. **Methods:** A total of 42 patients with renal cancer admitted to Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital of Suzhou University from April 2012 to November 2017 were enrolled to collect samples of surgically resected renal carcinoma tissues and paracancerous tissues. Expression of miR-19a-3p was detected in renal carcinoma tissues and 4 types of renal carcinoma cell lines such as 786-O by quantitative Real-time polymerase chain reaction (qPCR). The effects of miR-19a-3p knockdown on proliferation, invasion and epithelial mesenchymal transition (EMT) of renal carcinoma 786-O cells were evaluated by CCK-8 assay, Transwell assay and immunofluorescence, respectively. Subsequently, dual luciferase reporter assay was used to verify whether CADM2 was a target gene of miR-19a-3p. Furthermore, Wb was applied to detect the regulatory effect of miR-19a-3p on AKT signaling pathway through CADM2. **Results:** miR-19a-3p expression was significantly up-regulated in renal carcinoma tissues and cell lines (all $P < 0.01$). Knockdown of miR-19a-3p could inhibit proliferation, invasion and EMT process of 786-O cells; furthermore, the results indicated that CADM2 was a direct target of miR-19a-3p and its expression was down-regulated ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Additionally, knockdown of miR-19a-3p obviously suppressed proliferation, migration and EMT process of 786-O cells via up-regulating CADM2 and blocking AKT pathway (all $P < 0.05$ or $P < 0.01$), thus alleviating the occurrence and development of renal carcinoma. **Conclusion:** The study demonstrates that miR-19a-3p has a high expression level in renal carcinoma tissues; knockdown of miR-19a-3p could significantly inhibit the proliferation, migration and EMT process of renal carcinoma tissues, and its mecha-

[基金项目] 苏州市科技发展计划资助项目 (No. YSD2018149)。Project supported by the Science and Technology Development Plan of Suzhou City (No. SYSD2018149)

[作者简介] 杨静 (1979-), 女, 博士, 主治医师, 主要从事于肾肿瘤相关疾病的基础与临床研究, E-mail: jingyang@suda.edu.cn

[通信作者] 杨爱祥 (YANG Aixiang, corresponding author), 硕士, 副主任医师, 主要从事于重症肾病基础与临床研究, E-mail: yax0001@126.com

nism may be associated with miR-19a-3p/CADM2/AKT axis.

[Key words] renal carcinoma; 786-O cell; miR-19a-3p; cell adhesion molecule 2 (CADM2); epithelial mesenchymal transition (EMT)

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(3): 280-286. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.03.005]

肾癌是起源于肾实质泌尿小管上皮系统的恶性肿瘤,占成人肾脏恶性肿瘤的80%~90%。肿瘤转移是肾癌治疗失败和患者死亡的主要原因,而肿瘤转移通常是由肿瘤细胞增殖和迁移能力增强所致的。研究^[1]发现,microRNA(miRNA)可参与调控肿瘤细胞增殖、侵袭和上皮间质转化等过程。miRNA发挥功能多是通过靶基因作用而影响mRNA的翻译过程,进而调控肿瘤细胞的功能,如miR-19a被报道通过调控下游蛋白介导肾癌细胞增殖和侵袭^[2-3]。同时,miR-19a作为促癌基因,参与调控乳腺癌^[4]、卵巢癌^[5]、胃癌^[6]、胆囊癌^[7]和前列腺癌^[8]等多种恶性肿瘤细胞增殖和转移作用。细胞黏附分子2(cell adhesion molecule 2,CADM2)作为抑癌因子,在肾透明细胞癌组织和细胞系中低表达,且其过表达可显著下调肾癌细胞增殖及肿瘤的生长^[9]。同时,生物信息学预测发现CADM2是miR-19a-3p的靶向作用基因,然而miR-19a通过靶向调控CADM2介导肾癌细胞增殖和迁移的分子机制目前尚未有相关报道。为此,本研究通过对miR-19a-3p在肾癌组织样本及细胞系的表达水平进行研究,并深入探讨miR-19a-3p通过调控CADM2/AKT信号通路介导肾癌细胞增殖和迁移的分子机制,为肾癌患者早期诊断和治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 临床材料

收集2012年4月至2017年11月苏州大学附属第一医院肾内科收治的42例资料完整的肾癌患者,经手术切除的肾癌组织和癌旁组织标本迅速保存于液氮中。入选标准:(1)经肝肾功能、病理学、影像学检查结果确诊为肾癌;(2)治疗前2周没有经放化疗等治疗手段。排除标准:(1)之前进行任何放疗或化疗的患者;(2)患者不同意样本的采集;(3)合并有免疫系统疾病的患者。42例患者中,男性28例、女性14例;年龄(49.3±7.1)岁;T₁~N₀M₀期7例、T₁~N₁M₀期24例、T₃N₀M₀期5例、T₃N₁M₀期6例。所有研究对象对本研究均签署知情同意书,研究方案经苏州大学附属第一医院伦理委员会批准。

1.2 细胞系与主要试剂、仪器

人肾癌细胞系(786-O、ACHN、A704和A498)和人肾上皮细胞(HK-2)均购自中科院上海细胞研究所。miR-19a-3p和CADM2的敲减载体购自上海吉玛制药技术有限公司,DMEM和胎牛血清购自美国

Biological Industries公司,青霉素和链霉素均购自北京雷根生物技术有限公司,CCK-8试剂盒购自武汉华美生物工程有限公司,Transwell小室购自美国康宁公司,DNA酶和Lipofectamine™ 2000和逆转录试剂盒均购自日本TaKaRa公司,高纯总RNA快速提取试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司,蛋白提取试剂盒和SDS-PAGE凝胶快速制备试剂盒均购自美国Bio-Rad公司,免疫印迹一抗[兔抗人-CADM2(1:1 000)、兔抗人-E-cadherin(1:1 000)、兔抗人-N-cadherin(1:1 000)和兔抗人-Vimentin(1:1 000)]和二抗[羊抗兔IgG(H+L)(1:500)]均购于购自美国CST公司,双荧光素酶报告基因试剂盒和报告基因载体均购自Promega公司。酶标仪、荧光定量PCR仪、电泳仪和凝胶成像系统均购自美国Thermo Fisher Scientific公司,超速冷冻离心机、电泳槽均购自北京六一生物科技有限公司,共聚焦成像研究系统购自日本Nikon公司。

1.3 细胞培养及转染

人肾癌(786-O、ACHN、A704和A498)和人肾上皮细胞(HK-2)采用含10%胎牛血清、青霉素100 U/ml和链霉素100 μg/ml的DMEM培养液在37℃、5%CO₂培养箱中常规培养。选取对数生长期的肾癌786-O细胞,采用胰酶消化后,再利用DMEM培养基调整密度为1×10⁵个/ml。然后,将细胞接种到6孔板,每孔添加2 ml细胞悬液,并于37℃、5%CO₂培养箱培养24 h,随后进行miR-19a-3p inhibitor和CADM2 siRNA转染,其转染方法参考Lipofectamine™ 2000转染试剂说明书,转染48 h后于荧光显微镜下观察细胞的转染效果。

1.4 qPCR法检测肾癌组织和细胞中miR-19a-3p和CADM2的表达

收集临床样本及转染后48 h的肾癌细胞,并采用TRIzol一步法分别提取组织和细胞中总RNA;随后,NanoDrop检测RNA的浓度及纯度,并逆转录制备cDNA。然后,取2 μl逆转录产物进行PCR检测,采用U6作为内参,引物序列:U6 F为5'-CTCGCTTCG-GCAGCACA-3',R为5'-AACGCTTCACGAATTT-GCGT-3';miR-19a-3p F为5'-CAATCCTCTCAGGCTCAGTCC-3',R为5'-TAIGCTTGTTCTCGTCTCTGTGTC-3';CADM2 F为5'-AATCGCAAGACAT TCACTG-3',R为5'-ACAGCCACTATTCCTCC-3';β-actin F为5'-GGCTGTATTCCCCTCCATCG-3',R为5'-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3'。随后,按试剂盒

说明建立终体积为20 μl 的PCR反应体系、2 μl 逆转录产物、10 μl SYBR Green Mix、上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各0.5 μl 。PCR热循环参数为:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,然后3步反应:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,进行45个循环。检测结果采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行计算。实验重复3次。

1.5 Wb检测肾癌细胞中CADM2和上皮间质转化相关蛋白的表达水平

提取细胞总蛋白后,依据二喹啉甲酸试剂盒的指导要求检测蛋白浓度。上样缓冲液加入萃取的蛋白后,加热至95 $^{\circ}\text{C}$,维持10 min。每孔样品的载药量是30 μg ,添加10%的聚丙烯酰胺凝胶以分离蛋白。凝胶电泳的电压控制在80~120 V,湿式转运和转膜的压力控制在100 mV,持续45~70 min。在聚偏二氟乙烯转膜后,蛋白密封于5%的牛血清蛋白中维持1 h,再向其中加入一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 下过夜培养。洗膜缓冲液冲洗蛋白3次,每次5 min,随后加入二抗,温室中培养1 h。再洗膜3次后,加入化学发光试剂显影蛋白。 β -actin用作内参,Bio-rad Gel Doc EZ成像器用来成像蛋白,采用Image J软件分析靶带的灰度水平。实验重复3次。

1.6 免疫荧光法检测肾癌细胞中上皮间质转化标志物的表达情况

取经过处理后的786-O细胞采用固定液固定,洗涤液洗涤后,封闭液室温封闭1 h,洗涤液洗涤,加入E-cadherin和Vimentin抗体4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。洗涤液洗涤,加入山羊抗小鼠抗体,室温孵育1 h,洗涤液洗涤,将载玻片在4-,6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)中染色5 min,可见细胞核,并使用共聚焦成像研究系统检测。实验重复3次。

1.7 CCK-8实验检测肾癌细胞增殖活力

将处于对数生长期的转染前、后肾癌786-O细胞接种于96孔板(每孔含细胞 1×10^4 个),每孔含培养基100 μl 。于待检测前1 h,向每孔加入10 μl CCK-8溶液。将培养板在培养箱内孵育1~4 h。用酶标仪测定在450 nm处的光密度(D)值。实验重复3次。

1.8 Transwell实验检测肾癌细胞迁移能力

选择转染细胞为实验组,未转染为对照组。分别将各处理组细胞用胰酶消化处理后,接种于Transwell小室24孔板内,上室加100 μl (细胞密度为 2×10^5 个/ml)细胞悬液,下室加250 μl 含10%胎牛血清的培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养48 h后,取出小室,棉签擦去微孔膜上室侧的细胞,PBS小心冲洗小室上下面2遍,4%的多聚甲醛固定迁移并黏附到小室微孔膜下面的细胞15 min,结晶紫染色15 min,PBS冲洗小室,干燥后置于100倍的倒置显微镜观察。实验重复3次。

1.9 双荧光素酶报告基因验证miR-19a-3p和CADM2的靶向关系

首先将miR-19a-3p的候选靶基因CADM2 3' UTR靶序列插入到萤火虫荧光素酶基因下游。将表达载体pcDNA-EGFP-pre-miR-19a-3p与其靶基因CADM2验证载体pmirGLO-miR-19a-3p-CADM2 3' UTR分别共转染到293T细胞,并设置空质粒载体与miR-19a-3p表达载体共转染对照。具体方法为:在24孔板中,转染pmir-GLO-miR-基因3' UTR 200 ng、pcDNA-EGFP-pre-miRNA 600 ng。50 μl Opti-MEM I培养基稀释2 μl LipofectamineTM 2000试剂后室温孵育5 min;混合需转染的DNA和稀释的LipofectamineTM 2000,室温孵育20 min后直接将复合物加到含0.4 ml Opti-MEM I培养基的细胞中,轻轻摇动培养板混匀;在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养8 h后换0.5 ml含10%胎牛血清,不含抗生素的正常DMEM培养基,在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养48 h,收集细胞。荧光素酶检测按照双荧光素酶报告基因试剂盒说明书,采用酶标仪检测萤火虫和海肾荧光值,并以海肾荧光值作为内参。实验重复3次。

1.10 统计学处理

采用SPSS 22.0统计学软件和GraphPad Prism 5.0作图软件,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 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 miR-19a-3p在肾癌组织及细胞系中高表达

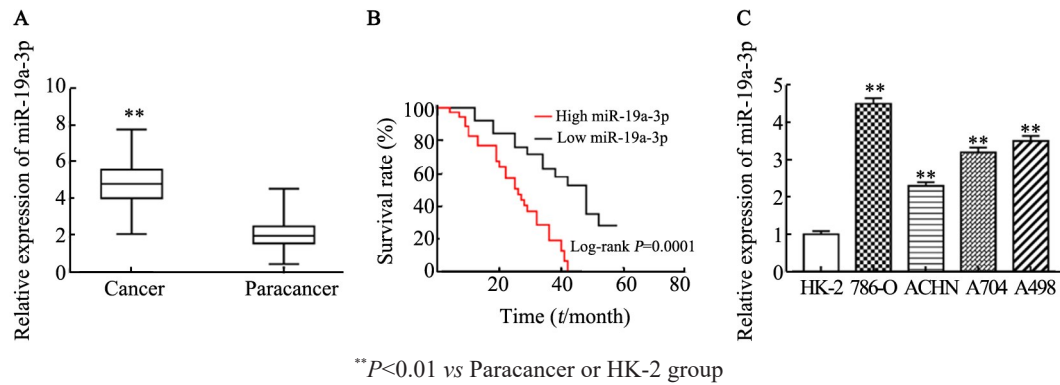
qPCR检测结果显示,miR-19a-3p在肾癌患者组织中的表达水平明显高于癌旁组织($t=12.01$, $P < 0.01$;图1A)。同时,采用Kaplan-Meier生存曲线分析显示,miR-19a-3p表达上调的患者预后较差,生存率显著低于miR-19a-3p低表达的患者($P < 0.01$,图1B)。此外,miR-19a-3p在肾癌细胞系(786-O、ACHN、A704和A498)中的表达水平显著高于人肾上皮细胞(HK-2)($t=-20.0$ 、 -9.66 、 -13.91 、 -15.02 ,均 $P < 0.01$;图1C),且786-O细胞中miR-19a-3p的表达水平高于ACHN、A704和A498。表明miR-19a-3p的高表达可能与肾癌的发生发展有关,并选择肾癌786-O细胞进行后续实验。

2.2 敲减miR-19a-3p显著抑制了786-O细胞增殖、侵袭和上皮间质转化

qPCR检测结果显示,敲减miR-19a-3p可稳定下调miR-19a-3p在肾癌786-O细胞中的表达水平($t=8.37$, $P < 0.01$;图2A)。CCK-8检测结果显示,敲减miR-19a-3p可显著抑制786-O细胞增殖活力($t=2.12$,

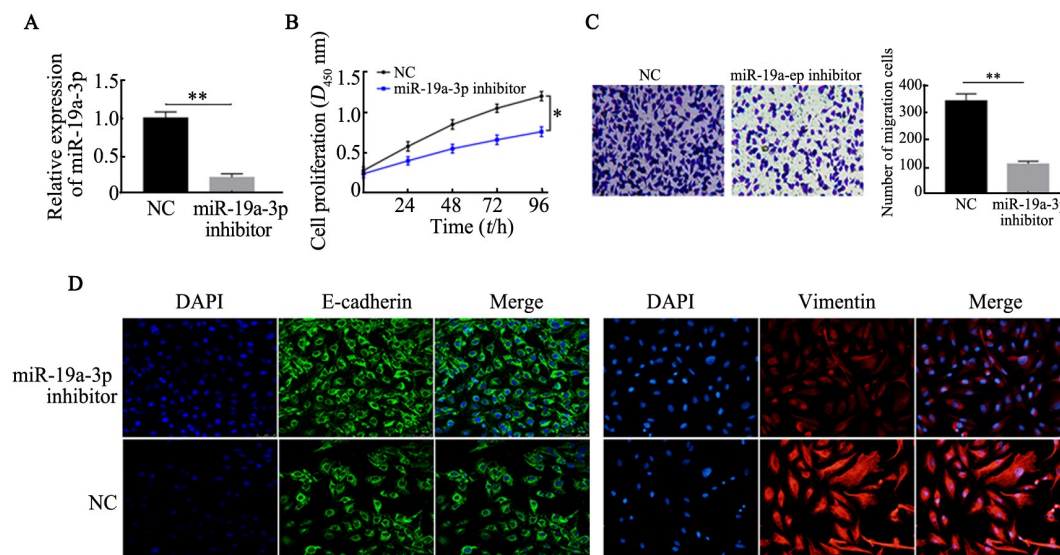
$P < 0.05$, 图2B)。Transwell 检测结果显示, 敲减 miR-19a-3p 后 786-O 细胞侵袭能力明显受到抑制 ($t=8.20$, $P < 0.01$; 图2C)。免疫荧光染色结果显示, 敲减 miR-19a-3p 显著抑制了间质细胞标志物 Vimentin 的表达,

促进了上皮细胞标志物 E-cadherin 的表达(图2D)。上述结果表明, 敲减 miR-19a-3p 显著抑制了 786-O 细胞增殖、侵袭和上皮间质转化。



** $P < 0.01$ vs Paracancer or HK-2 group
A and C: Expression of miR-19a-3p measured by qPCR;
B: Overall survival of patients with different miR-19a-3p expression in Kaplan-Meier analysis

图1 miR-19a-3p在肾癌组织及细胞系中的表达水平
Fig. 1 Expression of miR-19a-3p in renal carcinoma tissues and cell lines



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$
A: Expression of miR-19a-3p detected by qPCR; B: Effect of miR-19a-3p on the proliferation of 786-O cells detected by CCK-8;
C: Effect of miR-19a-3p on migration of 786-O cells by Transwell assay ($\times 100$); D: Expression of EMT markers in 786-O cells transfected with miR-19a-3p inhibitor by immunofluorescence ($\times 100$); Red: Vimentin; Green: E-cadherin; Blue: DAPI

图2 敲减 miR-19a-3p 对 786-O 细胞增殖、迁移和上皮间质转化的影响
Fig. 2 Effect of miR-19a-3p knockdown on proliferation, migration and EMT of 786-O cells

2.3 miR-19a-3p 靶向调控 CADM2 的表达

采用生物信息学数据库 StarBase 对 miR-19a-3p 靶基因进行了预测, 结果(图3A)显示, CADM2 是 miR-19a-3p 的候选靶基因, miR-19a-3p 可以结合 CADM2 的 3' UTR。荧光素酶报告基因验证实验显示, miR-19a-3p 可以负调控 CADM2 的表达 ($t=6.72$, $P < 0.01$; 图3B)。Wb 检测结果显示, miR-19a-3p 敲减

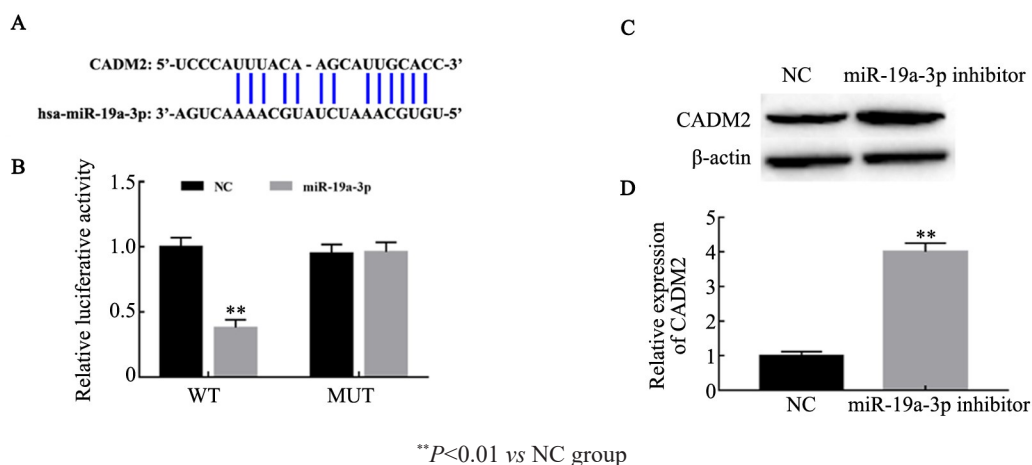
后可显著促进 CADM2 在 786-O 细胞中的表达水平 ($t=-10.82$, $P < 0.01$; 图3C、D)。结果表明, CADM2 是 miR-19a-3p 的靶基因, 并且 miR-19a-3p 可对 CADM2 的表达进行负调控。

2.4 CADM2 对 AKT 信号通路具有调控作用

为了进一步探索 CADM2 参与调控肾癌进程的作用机制, 采用 Wb 检测 CADM2 对 AKT 信号通路中

相关蛋白的表达水平,结果(图4)显示,CADM2过表达后可显著抑制 p-AKT 的表达水平($t=7.49, P<$

0.01),但 AKT 的表达水平与对照组没有显著差异($t=0.589, P>0.05$)。



A: The bioinformatics analysis result showed that miR-19a-3p had a binding site with CADM2; B: The luciferase activity in CADM2-wt transfected with miR-19a-3p was lower than that in NC group detected by dual-luciferase reporter assay; C and D: Wb was applied to detect the expression of CADM2

图3 miR-19a-3p 能够靶向结合 CADM2 3'UTR

Fig. 3 miR-19a-3p showed targeted binding with CADM2 3'UTR

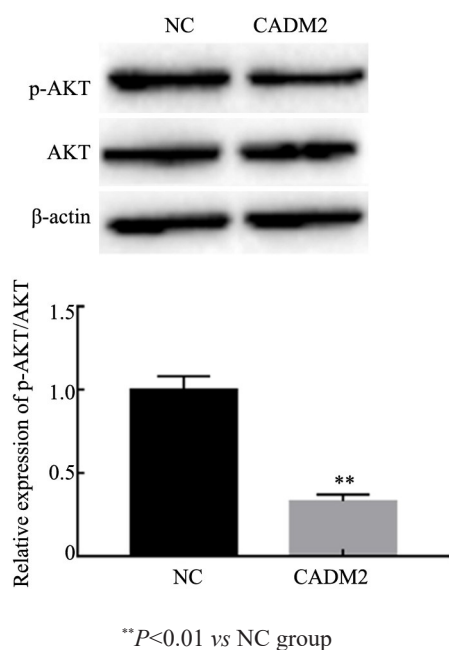


图4 CADM2 过表达可阻断 AKT 信号通路

Fig. 4 CADM2 over-expression blocked the AKT signaling pathway

2.5 miR-19a-3p 通过靶向 CADM2 调控 AKT 信号通路介导肾癌细胞增殖和转移

为了进一步明确 miR-19a-3p 通过靶向下调 CADM2 并激活 AKT 信号通路影响 786-O 细胞增殖、侵袭和上皮间质转化的作用机制。通过在 786-O 细胞中分别转染 miR-19a-3p inhibitor、miR-19a-3p inhibitor + si-CADM2 和 miR-19a-3p inhibitor + IGF-1。

Wb 检测结果显示,敲减 miR-19a-3p 可显著提高 CADM2 及下调 p-AKT 的表达水平,而敲减 miR-19a-3p 的同时沉默 CADM2 或添加 AKT 通路激动剂 IGF-1 能够逆转单独敲降 miR-19a-3p 对 CADM2 和 p-AKT 表达水平的调控作用($t=-13.41, P<0.01; t=3.48, P<0.05$; 图 5A、B、C)。此外,Wb 检测结果进一步证实,敲减 miR-19a-3p 可显著促进 E-cadherin 的表达水平($t=-9.40, P<0.01$),抑制了 N-cadherin 和 Vimentin 蛋白的表达水平($t=-5.46、6.22$, 均 $P<0.05$),但同时沉默 CADM2 或激活 AKT 信号通路后则显著逆转了 miR-19a-3p 敲减后对上皮间质转化的抑制作用(图 5D)。CCK-8 和 Transwell 实验检测结果(图 5E、F、G)均证实,敲减 miR-19a-3p 后显著抑制 786-O 细胞的增殖及侵袭能力($t_{CCK-8}=2.45, P<0.05; t_{Transwell}=-9.76, P<0.01$)。同时沉默 CADM2 或激活 AKT 信号通路后则显著下调敲减 miR-19a-3p 的抑制作用($t_{CCK-8}=2.18、1.94$, 均 $P<0.05; t_{Transwell}=-10.33、-10.26$, 均 $P<0.01$)。由此可知,敲减 miR-19a-3p 通过上调 CADM2 并阻断 AKT 信号通路抑制肾癌细胞增殖、侵袭和上皮间质转化。

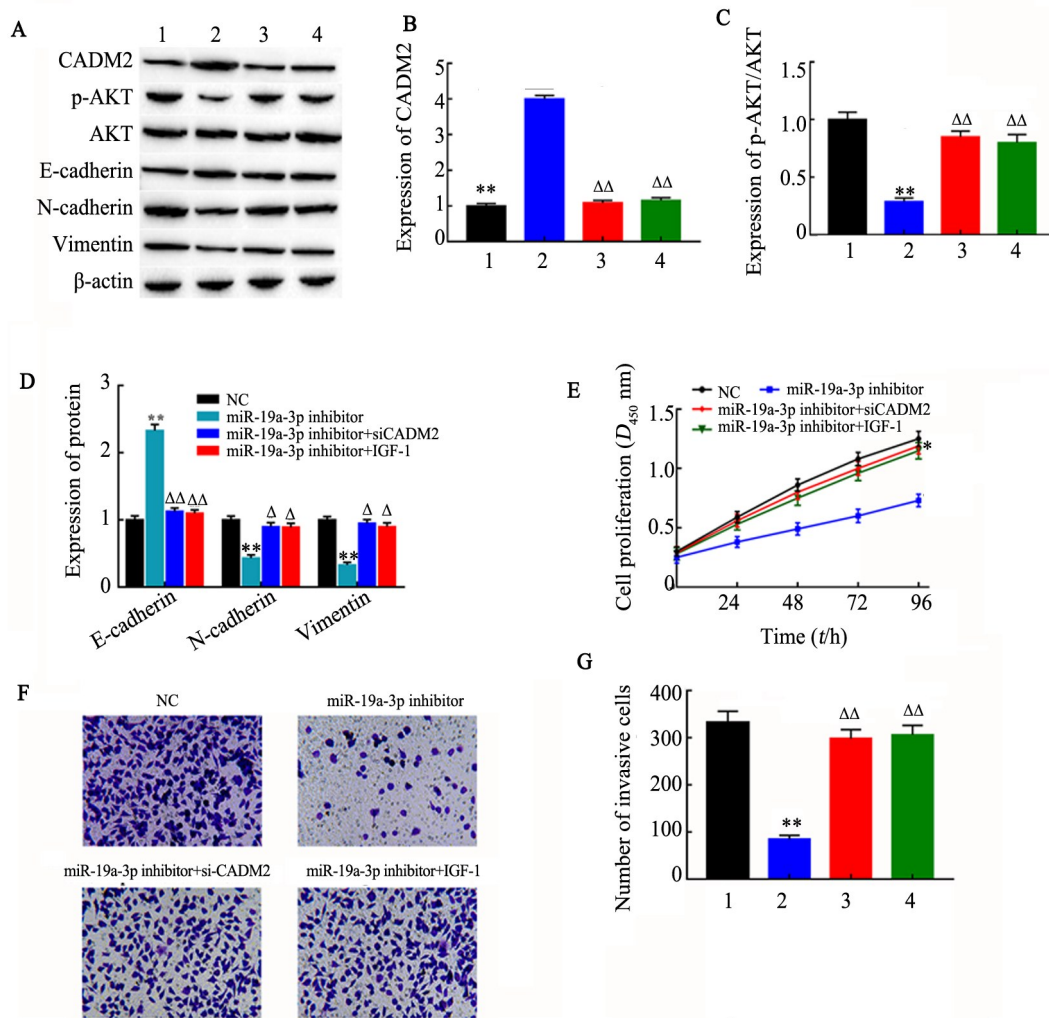
3 讨论

肾癌是高发于男性人群的泌尿系统恶性肿瘤。肾癌早期大多无典型的临床表现,大多数在确诊时已经发生转移,失去了手术机会,且放化疗效果不明显,主要是因为其存在高转移和侵袭的特性^[10]。为

此,深入研究肾癌细胞侵袭以及迁移的分子机制,对于揭示肾癌发生发展机制,以及肾癌靶向治疗具有重要意义。

近几年,研究^[11]发现 miRNA 通过调节靶基因与蛋白相互作用等各种生物网络相互交织组成了复杂的调控体系,在肿瘤发生、发展中起着重要的作用,广泛参与肿瘤侵袭迁移过程中的基因表达调控。有研究^[12]发现,miR-203a、miR-21、miR-17 和 miR-199a 参与肾癌的发生发展进程。同时,也有研究^[13]发现,

miR-17-92 基因簇在多种肿瘤组织中高表达,且在多种肿瘤的发生发展中起到至关重要的作用。如 miR-19a 和 miR-19b 在肾透明细胞癌组织中高表达,并且可通过靶向下调 RhoB 促进肾透明细胞癌细胞增殖、迁移作用。本研究也证实,miR-19a-3p 在肾癌组织中高表达,并通过调控下游蛋白参与调控肾癌细胞增殖和侵袭能力,且该结果与 MA 等^[14]和 XIAO 等^[3]研究结果一致。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs NC group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs miR-19a-3p inhibitor group

A-D: Wb was applied to measure the expression of CADM2, AKT and EMT marker protein; E: CCK-8 was used to evaluate cell proliferation viability; F and G: Transwell assay was applied to evaluate the migration of 786-O cells($\times 200$)

1: NC; 2: miR-19a-3p inhibitor; 3: miR-19a-3p inhibitor+si-CADM2; 4: miR-19a-3p inhibitor+IGF-1

图5 miR-19a-3p 靶向CADM2 调控AKT 通路对肾癌细胞增殖和转移的影响

Fig. 5 miRNA-19a-3p affects proliferation and metastasis of renal carcinoma cells by targeting CADM2 and regulating AKT pathway

CADM2 是细胞黏附分子家族成员,参与细胞之间的信息传递与细胞极性的维持。它可以通过自身表达上调调控细胞信号转导,影响细胞增殖、迁移能力,在肿瘤的发生发展中起到重要的作用。YANG

等^[15]研究发现,miR-146a 通过靶向下调 CADM2 促进肾癌细胞增殖、迁移和侵袭能力。同时,本研究也同样证实,敲减 miR-19a-3p 通过靶向上调 CADM2 并激活 AKT 信号通路抑制肾癌细胞增殖、侵袭和上皮间

质转化作用。AKT参与调控细胞增殖、凋亡、迁移和血管生成等过程^[16]。有研究^[17-19]表明,阻断PI3K/AKT通路可显著促进肾癌ACHN和786-O细胞凋亡。本研究表明,激活AKT信号通路(IGF-1)可显著缓解敲降miR-19a-3p对肾癌细胞增殖、迁移和上皮间质转化的抑制作用,这说明通过激活AKT信号通路可以促进肾癌细胞的迁移能力,与YANG等^[15]在肾癌786-O细胞中的研究结果一致。

综上所述,本研究通过细胞实验和临床样本充分证实,敲降miR-19a-3p通过上调CADM2并阻断Akt通路进而抑制肾癌细胞增殖、迁移和上皮间质转化,从而缓解肾癌发生发展进程。上述分子机制的揭示有可能作为肾癌细胞分化程度的辅助判定及早期诊断提供依据。然而,本研究仍存在一些不足之处,上述研究分子机制仍需构建动物移植瘤模型,进一步验证miR-19a-3p/CADM2/AKT信号通路对肾癌进程的作用机制,这也是后期研究的重点。

[参考文献]

- [1] DING X M. miRNAs: regulators of cancer metastasis and epithelial-mesenchymal transition (EMT)[J]. *Chin J Cancer*, 2014, 33(3): 140-147. DOI: 10.5732/cjc.013.10094.
- [2] NIU S, MA X, ZHANG Y, et al. miRNA-19a and microRNA-19b promote the malignancy of clear cell renal cell carcinoma through targeting the tumor suppressor RhoB[J/OL]. *PLoS One*, 2018, 13(2): e0192790[2018-09-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29474434>. DOI: 10.1371/journal.pone.0192790.
- [3] XIAO W, GAO Z, DUAN Y, et al. Downregulation of miR-19a exhibits inhibitory effects on metastatic renal cell carcinoma by targeting PIK3CA and inactivating Notch signaling in vitro[J]. *Oncol Rep*, 2015, 34(2): 739-746. DOI: 10.3892/or.2015.4041.
- [4] WU J, JIANG Y, CAO W, et al. miR-19 targeting of PTEN mediates butyl benzyl phthalate-induced proliferation in both ER(+) and ER(-) breast cancer cells[J]. *Toxicol Lett*, 2018, 295(2): 124-133. DOI: 10.1016/j.toxlet.2018.05.040.
- [5] WANG Y, ZHAO S, ZHU L, et al. miR-19a negatively regulated the expression of PTEN and promoted the growth of ovarian cancer cells [J]. *Gene*, 2018, 670(2): 166-173. DOI: 10.1016/j.gene.2018.05.063.
- [6] QIAO F, GONG P, SONG Y, et al. Downregulated PITX1 modulated by miR-19a-3p promotes cell malignancy and predicts a poor prognosis of gastric cancer by affecting transcriptionally activated PDCD5[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(6): 2215-2231. DOI: 10.1159/000489590.
- [7] LI H, JIN Y, HU Y, et al. The PLGF/c-MYC/miR-19a axis promotes metastasis and stemness in gallbladder cancer[J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(5): 1532-1544. DOI: 10.1111/cas.13585.
- [8] FU F, WAN X, WANG D, et al. miRNA-19a acts as a prognostic marker and promotes prostate cancer progression via inhibiting VPS37A expression[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(2): 1931-1943. DOI: 10.18632/oncotarget.23026.
- [9] HE W, LI X, XU S, et al. Aberrant methylation and loss of CADM2 tumor suppressor expression is associated with human renal cell carcinoma tumor progression[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 435(4): 526-532. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.04.074.
- [10] WANG M, SUN Y, XU J, et al. Preclinical studies using miR-32-5p to suppress clear cell renal cell carcinoma metastasis via altering the miR-32-5p/TR4/HGF/Met signaling[J]. *Int J Cancer*, 2018, 143(1): 100-112. DOI: 10.1002/ijc.31289.
- [11] BLANDINO G, FAZI F, DONZELLI S, et al. Tumor suppressor microRNAs: a novel non-coding alliance against cancer[J]. *FEBS Lett*, 2014, 588(16):2639-2652. DOI: 10.1016/j.febslet.2014.03.033.
- [12] AL-ALI B M, RESS A L, Gerger A, et al. miRNAs in renal cell carcinoma: implications for pathogenesis, diagnosis, prognosis and therapy[J]. *Anticancer Res*, 2012, 32(9): 3727-3732. DOI:10.1016/j.pdpdt.2012.07.004
- [13] QIN S, AI F, JI W F, et al. miR-19a promotes cell growth and tumorigenesis through targeting SOCS1 in gastric cancer[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14(2): 835-840. DOI: 10.7314/APJCP.2013.14.2.835.
- [14] MA Q, PENG Z, WANG L, et al. miR-19a correlates with poor prognosis of clear cell renal cell carcinoma patients via promoting cell proliferation and suppressing PTEN/SMAD4 expression[J]. *Int J Oncol*, 2016, 49(6): 2589-2599. DOI: 10.3892/ijo.2016.3746.
- [15] YANG L, ZHAO G, WANG F, et al. Hypoxia-regulated miR-146a targets cell adhesion molecule 2 to promote proliferation, migration, and invasion of clear cell renal cell carcinoma[J/OL]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49(3): 122[2018-09-19]. https://www.onacademic.com/detail/journal_1000040479087010_de17.html. DOI: 10.1159/000493224.
- [16] GUO H, GERMAN P, BAI S, et al. The PI3K/AKT pathway and renal cell carcinoma[J]. *J Genet Genomics*, 2015, 42(7): 343-353. DOI: 10.1016/j.jgg.2015.03.003.
- [17] HE D, SUN X, YANG H, et al. TOFA induces cell cycle arrest and apoptosis in ACHN and 786-O cells through inhibiting PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. *J Cancer*, 2018, 9(15): 2734-2742. DOI: 10.7150/jca.26374.
- [18] 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. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.09.014.
- [19] YUAN H, MENG X, GUO W, et al. Transmembrane-bound IL-15-promoted epithelial-mesenchymal transition in renal cancer cells requires the src-dependent AKT/GSK-3beta/β-catenin pathway[J]. *Neoplasia*, 2015, 17(5): 410-420. DOI: 10.1016/j.neo.2015.04.002.

[收稿日期] 2018-11-11

[修回日期] 2019-02-08

[本文编辑] 王映红