

网络出版时间: 2021-2-22 14:50 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20210222.1102.001.html>

miR-21 调控 STAT3 信号通路对肾母细胞瘤 细胞增殖及迁移的影响

符策君¹ 吴丽珍² 陈泽婷¹ 林海¹ 孙为增¹

摘要 目的 探讨 miR-21 调控 STAT3 信号通路对肾母细胞瘤细胞的增殖及迁移产生影响。方法 RT-PCR 测定人肾母细胞瘤组织以及癌旁组织中 miR-21 的表达。将人肾母细胞瘤细胞分为空白组、si-miR-21 组(转染 si-miR-21)和 si-miR-21 NC 组(转染 si-microRNA-21 NC), Western blot 检测 STAT3 信号通路中相关蛋白和凋亡相关蛋白的表达, MTS 实验检测细胞的增殖活性, 流式细胞术检测细胞的凋亡, Transwell 实验检测迁移能力。结果 与癌旁组织相比, 人肾母细胞瘤组织的 miR-21 相对表达量明显升高($P < 0.05$)。细胞转染后 3 组 p-STAT3、Bcl-2、Bcl-xl 相对表达量、A490 吸光度值以及细胞迁移数差异均有统计学意义($P < 0.001$), 与空白组比较, si-miR-21 组升高($P < 0.05$), si-miR-21 NC 组下降($P < 0.05$)。三组细胞凋亡率差异有统计学意义($P < 0.001$), 与空白组比较, si-miR-21 组下降($P < 0.05$), si-miR-21 NC 组升高($P < 0.05$)。转染细胞 miR-21 与 p-STAT3、Bcl-2 及 Bcl-xl 呈正相关($r = 0.824, 0.778, 0.837, P < 0.001$)。结论 过表达 miR-21 促进肾母细胞瘤细胞的增殖及迁移作用, 其机制可能是通过上调 STAT3 信号通路来实现。

关键词 miR-21; STAT3 信号通路; 肾母细胞瘤; 增殖; 迁移
中图分类号 Q 812

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)03-0423-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.03.017

肾母细胞瘤是一种临床上常见的小儿恶性肿瘤^[1-2], 一般在 1~3 岁时期发病, 几率约为 8%^[3], 首发症状主要为腹部出现肿块^[4], 其发生对于病患的致残率、病死率以及家庭的生活状态均有一定的影响^[5]。肾母细胞瘤的治疗主要以手术及放化疗为主, 对患儿的生存率有一定的积极影响^[6], 但仍有一部分患儿疗效、预后不佳^[7], 因此对其发生进展的相关机制进行研究至关重要。微小 RNA(microRNA, miR) 是一种具有高度保守性质的非编码小

RNA, 对机体的生理病理等方面具有不可或缺的参与调控作用^[8]。在癌细胞的增殖、迁移、凋亡等过程中都有着举足轻重的调控作用^[9]。该研究就 miR-21 在 STAT3 信号通路上对肾母细胞瘤细胞生长迁移的相关机制进行研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞系 人肾母细胞瘤细胞系购自上海药试生物技术有限公司, 货号 CS-011-0148。

1.1.2 主要试剂 miR-21 模拟物及 miR-NC 购自江苏百奥迈科公司; hsa-mir-21、DMEM 培养基(货号: 1165-092)、胰蛋白酶(货号: 25200-072)、胎牛血清(货号: 10735078001) 购自上海基免实业公司; Li-pofectamineTM 2000 转染试剂(货号: 11668-019)、TRIzol 试剂盒(货号: RG008) 购自美国 Thermo Fisher 公司; Real-time PCR 试剂盒(货号: E090) 购自上海欣百诺生物公司; SDS-PAGE 凝胶快速配置制试剂盒(货号: SJH0899) 购自上海如吉生物公司。

1.1.3 主要仪器 Mx 3005P 荧光定量 PCR 仪(美国 Agilent 公司); 凝胶成像系统 BioSenSC300(上海山富科学仪器有限公司); GL20A 全自动高速冷冻离心机(湖南仪器仪表厂离心机厂); MV-III 型小型垂直板电泳槽、OS-I 型回旋脱色摇床、MV-II 型垂直板电泳槽(大连竞迈科技生物有限公司); Y-ZCP3000 型电泳仪(北京君意东方电泳设备公司)。

1.2 病例资料 肾母细胞瘤组织和癌旁组织标本选自 2015 年 1 月—2019 年 12 月海南省人民医院收治且经病理组织学确诊为肾母细胞瘤患儿 32 例, 男女比例为 20/12, 年龄 0~8(3.54±1.90) 岁, 同时选取癌旁组织(距癌≥3 cm) 作为对照。该研究通过了医院伦理委员会批准, 符合道德伦理要求, 且得到患儿监护人同意并签署知情同意书。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培育人肾母细胞瘤细胞系 G401 细胞株, 置

2020-10-11 接收

基金项目: 海南自然科学基金面上项目(编号: 20168283)

作者单位: 海南省人民医院¹ 小儿外科、² 手术室, 海口 570311

作者简介: 符策君, 男, 本科, 副主任医师;

吴丽珍, 女, 主管护理师, 责任作者, E-mail: fucj1za@163.com

于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中,当细胞生长至融合度 82% 左右,用胰蛋白酶进行 1 min 的消化,进行传代培养 1~2 d 更换 1 次培养基,选取保存生长良好的细胞株进行实验。

1.3.2 细胞转染 将培养的对数生长期人肾母细胞瘤细胞分为空白组、si-miR-21 组及 si-miR-21 NC 组。si-miR-21 组转染 miR-21 模拟物,si-miR-21 NC 组转染 miR-NC,空白组不做干预。操作步骤如下:将人肾母细胞瘤细胞按 60% 的密度进行接种混匀,第 2 天细胞融合度至 40% 的时候进行转染,2 次 PBS 洗涤后每孔均加入 DMEM 培养基(2 ml,含 20% 胎牛血清),用去离子水溶解 siRNA 至 20 μmol/L 将 siRNA 与 500 μl 无血清 DMEM 相溶混匀、静置,即 A 管,Li-pofectamine™ 2000 与无血清 DMEM 混匀静置,即 B 管,AB 管混匀静置 20 min 后加入各孔中,培养 4~6 h,更换培养基后继续培养 2 d。RT-PCR 检测转染效率,转染成功即进行后续实验。

1.3.3 RT-PCR 检测 miR-21 表达 利用裂解液裂解转染细胞及肾母细胞瘤组织和癌旁组织,TRIzol 法提取总 RNA,定量后通过一步法对 RNA 进行逆转录,合成 cDNA,按照 RT-PCR 试剂盒说明书完成 miR-21 表达的检测,以 GAPDH 作为内参,通过 2^{-ΔΔCt} 公式分析得到 miR-21 相对表达量。

1.3.4 Western blot 检测 STAT3 信号通路相关蛋白和凋亡相关蛋白的表达 细胞转染后,Western blot 检测 STAT3 信号通路相关蛋白和凋亡相关蛋白的相对表达量。操作步骤如下:提取转染细胞蛋白后,按照 BCA 试剂盒说明书定量分析,SDS-PAGE 电泳得到沉淀蛋白,保存于 -80 °C 下。准备工作完成后,加入 TBST 液稀释的一抗(1:200),PVDF 转膜 2 h 后培养于 4 °C 的条件下 12 h,完成后清洗,同样加入稀释的二抗(1:1 000),转膜,室温下进行 2 h 的培育,洗脱二抗后显影,以 β-actin 作为内参,对比灰度值后得出相关蛋白相对表达量。

1.3.5 MTS 实验检测细胞增殖活性 将 si-miR-21 组、si-miR-21 NC 组和空白组细胞接种于 96 孔板中,每孔 100 μl,实现细胞贴壁后收集检测,分别在 0、24、48、72 h 等时间段进行收集,然后将 CCK-8(10:1)加入其中,培育 4 h 后使用酶标仪对 A₄₉₀ 值进行检测,A₄₉₀ 值越高表示细胞增殖活性越强。

1.3.6 流式细胞术检测细胞凋亡情况 应用胰蛋白酶消化各组细胞后,加入 PBS 洗涤液洗涤,收集细胞后加入 Binding Buffer(500 μl)、Annexin V-FITC

(5 μl) 混匀,室温下避光培养 5 min,最后使用流式细胞仪测定各组细胞的凋亡情况。

1.3.7 Transwell 实验检测细胞的迁移能力 将培养的细胞进行细胞悬液配制后在 Transwell 小室的上层中接种,风干后将结晶紫(500 μl,0.1%)加入染色,显微镜下拍照并计数发生迁移状态的细胞数量。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 24.0 软件统计进行分析,数据资料采用 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示,两组间均数比较用独立样本 *t* 检验,3 组均数比较用单因素方差分析,两两比较行 LSD 检验,Pearson 检验分析双连续变量的相关性,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-21 的表达 miR-21 在肾母细胞瘤组织中相对表达量为 6.12 ± 1.03,在癌旁组织中的相对表达量 1.09 ± 0.26,两者差异有统计学意义(*t* = 26.663, *P* < 0.05)。

2.2 STAT3 信号通路相关蛋白及凋亡相关蛋白的表达结果 Western blot 检测结果显示(图 1),p-STAT3、Bcl-2 及 Bcl-xl 在空白组、si-miR-21 组和 si-miR-21 NC 组的相对表达水平差异有统计学意义(*F* = 52.335、20.952、58.471; *P* < 0.001)。与空白组比较,si-miR-21 组转染细胞 p-STAT3、Bcl-2 及 Bcl-xl 相对表达量升高(*P* < 0.05),si-miR-21 NC 组表达下降(*P* < 0.05)。与 si-miR-21 组比较,si-miR-21 NC 组转染细胞 p-STAT3、Bcl-2 及 Bcl-xl 相对表达量降低(*P* < 0.05)。

2.3 转染细胞 miR-21 表达与 p-STAT3、Bcl-2 及 Bcl-xl 表达水平相关性分析 由以上结果可知,干扰 miR-21 表达转染细胞 p-STAT3、Bcl-2 及 Bcl-xl 相对表达量受到影响,对转染细胞 miR-21 与 p-STAT3、Bcl-2 及 Bcl-xl 进行 Pearson 检验分析显示,miR-21 与 p-STAT3、Bcl-2 及 Bcl-xl 呈正相关,见表 1。

表 1 转染细胞 miR-21 与 p-STAT3、Bcl-2 及 Bcl-xl 相关性分析检验值

指标	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
p-STAT3	0.824	<0.001
Bcl-2	0.778	<0.001
Bcl-xl	0.837	<0.001

2.4 miR-21 对人肾母细胞瘤细胞增殖的影响 细胞转染后,A₄₉₀ 吸光度值随时间延长而增大,72 h

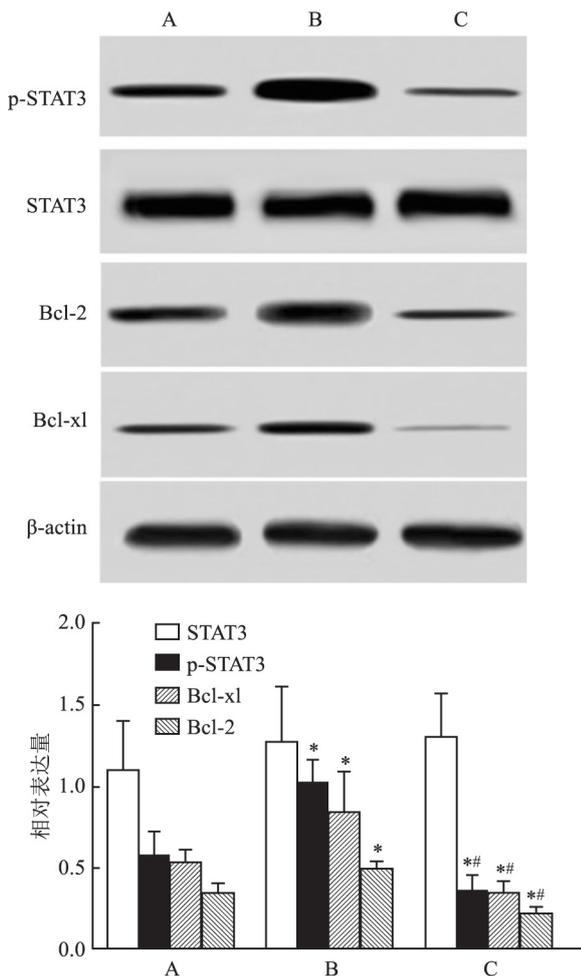


图1 Western blot 检测 STAT3 信号通路相关蛋白及凋亡相关蛋白表达结果

A: 空白组; B: si-miR-21 组; C: si-miR-21 NC 组; 与空白组比较: * $P < 0.05$; 与 si-miR-21 组比较: # $P < 0.05$

3 组 A_{490} 吸光度值差异有统计学意义 ($F = 11.990, P < 0.001$), 与空白组比较, si-miR-21 组转染细胞 A_{490} 吸光度值升高 ($P < 0.05$), si-miR-21 NC 组下降 ($P < 0.05$), 见图 2。

2.5 miR-21 对人肾母细胞瘤细胞凋亡的影响 细

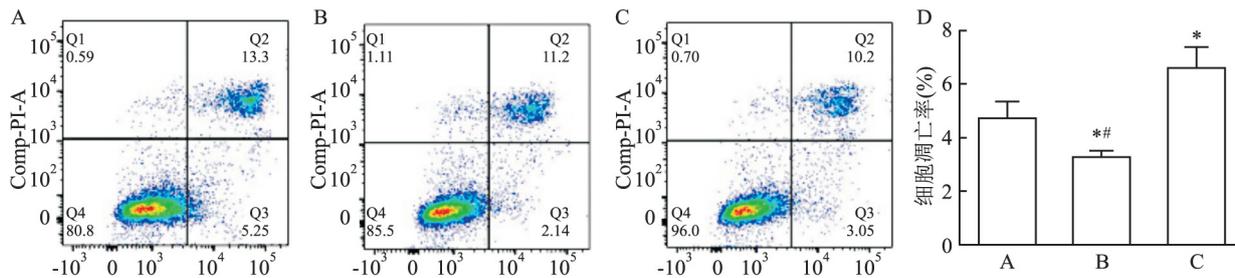


图3 各组转染细胞凋亡情况

A: 空白组; B: si-miR-21 组; C: si-miR-21 NC 组; 与空白组比较: * $P < 0.05$; 与 si-miR-21 NC 组比较: # $P < 0.05$

胞转染后, 细胞凋亡率空白组、si-miR-21 NC 组和 si-miR-21 组 3 组间差异有统计学意义 ($F = 57.413; P < 0.001$), 与空白组比较, si-miR-21 组转染细胞细胞凋亡率下降 ($P < 0.05$), si-miR-21 NC 组升高 ($P < 0.05$), 见图 3。

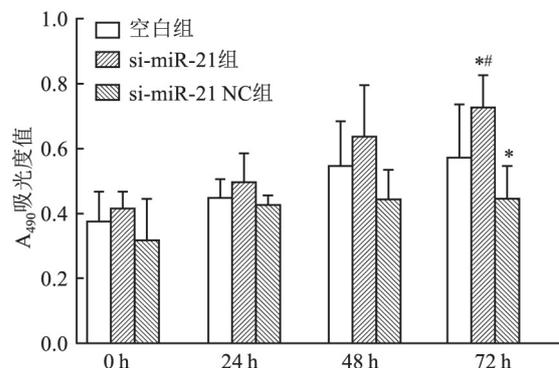


图2 各组转染细胞增殖情况

与空白组比较: * $P < 0.05$; 与 si-miR-21 NC 组比较: # $P < 0.05$

2.6 miR-21 对人肾母细胞瘤细胞迁移的影响 细胞转染后, 细胞迁移数空白组、si-miR-21 NC 组和 si-miR-21 组 3 组间差异有统计学意义 ($F = 81.580, P < 0.001$), 与空白组比较, si-miR-21 组细胞迁移数升高 ($P < 0.05$), si-miR-21 NC 组下降 ($P < 0.05$), 见图 4。

3 讨论

肾母细胞瘤是小儿腹部常见的一种恶性实体肿瘤, 肾母细胞瘤多为一侧发病, 少数双侧发病, 患儿早期或出现腹痛恶心、食欲不振等症状, 或表现出高血压、发热等症状, 晚期时消瘦、咯血等。目前多采用手术联合化疗的方式进行治疗, 但较多病例早期出现肺转移的状况, 出现预后不良的情况^[10], 因而对其相关机制进行研究, 从而提高预后效果就尤

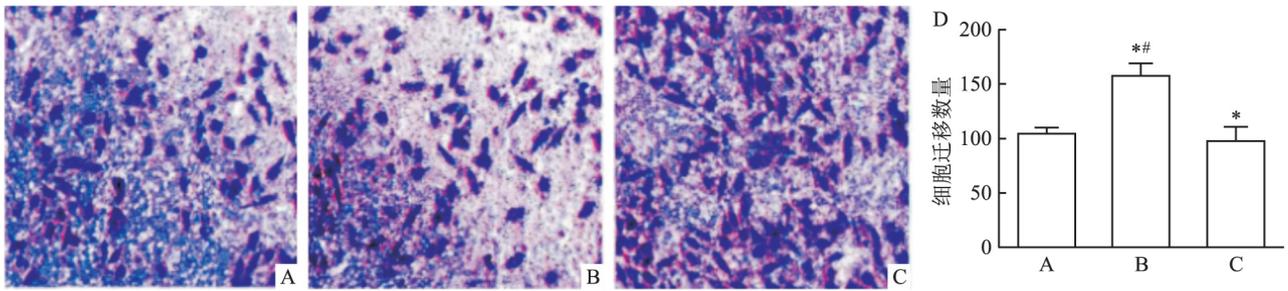


图4 各组转染细胞迁移情况 结晶紫染色 ×400

A: 空白组; B: si-miR-21 组; C: si-miR-21 NC 组; 与空白组比较: * P < 0.05; 与 si-miR-21 NC 组比较: # P < 0.05

为重要。

作为一种非编码小 RNA ,miR 可通过结合靶基因 3' -UTR 区 ,对目的基因的表达施行调控作用^[11]。大量研究^[12]表明 miRNA 与细胞的生命活动以及肿瘤的发生进展有关。miR-21 最早在脊椎以及非脊椎动物中发现 ,在大多数恶性肿瘤中呈现高表达的状态 ,如胃癌、乳腺癌、卵巢癌等^[13] ,可能与其发生进展有关。印滇 等^[14]在了解肝细胞癌以及 miR-21 的基础上对相关机制进行研究 通过细胞侵袭、细胞活力的检测以及靶基因关系分析后显示 ,miR-21 在肝癌细胞中呈高表达的状态 ,PDCD4 呈低表达的状态 ,最终得出 miR-21 可通过干扰 PDCD4 影响 HCC 细胞的生命活动。何少仪 等^[15]对宫颈癌患者中 miR-21 的表达进行检测。由此可知 miR-21 的高表达对患者具有消极影响 ,对于肿瘤的负荷情况具有反映作用。该研究结果显示 ,相比于癌旁组织 ,肾母细胞瘤的 miR-21 表达水平明显升高 ,提示 miR-21 呈高表达是影响肾母细胞瘤发生发展的潜在危险因素。STAT3 信号通路与大多数的炎症反应过程相关 ,也有证据表明 STAT3 是一种致癌基因 ,细胞周期进展相关的基因具有活化的作用 ,与细胞的增殖、存活等有关。

为了探讨 miR-21 对肾母细胞瘤细胞的增殖及迁移产生影响的相关机制 ,本研究选用人肾母细胞瘤细胞系 G401 细胞来进行研究 ,将其分为空白组、si-miR-21 组以及 si-miR-21 NC 组 ,通过转染 miR-21 类似物和抑制物干扰肿瘤细胞 miR-21 表达。Western blot 检测结果表明 si-miR-21 组转染细胞 p-STAT3、Bcl-2 及 Bcl-xl 相对表达量明显比空白组升高 ,而 si-miR-21 NC 组比空白组下降 ,结果表明干扰 miR-21 表达后转染细胞 p-STAT3、Bcl-2 及 Bcl-xl 蛋白表达水平明显发生变化 ,双变量相关分析显示 miR-21 与 p-STAT3、Bcl-2 及 Bcl-xl 蛋白呈正相关。p-STAT3 是表示 STAT3 信号通路活化的重要指标 ,

结果表明了 miR-21 过表达可加剧 STAT3 信号通路的活化。Bcl-2 和 Bcl-xl 蛋白作为细胞凋亡相关的蛋白 ,其表达水平升高可抑制细胞凋亡 ,而细胞流式术检测 3 组转染细胞凋亡率显示同样的结果 ,说明 miR-21 过表达会抑制肿瘤细胞的凋亡作用。此外 ,MTS 实验和 Transwell 实验显示 A490 吸光度值随时间延长而增大 ,72 h 时 si-miR-21 组转染细胞 A490 吸光度值高于空白组 ,si-miR-21 NC 组低于空白组 ;细胞迁移数增长趋势与 A490 吸光度值一致 ,提示过表达 miR-21 可促进转染细胞增殖和迁移作用。

综上 ,miR-21 对于肾母细胞瘤细胞的增殖以及迁移具有促进作用 ,其机制可能是通过上调 STAT3 信号通路的表达引起。

参考文献

- [1] Wang H L , Lou C Y , Ma N. miR-440-5p alleviates the aggressive progression of Wilms' tumor through directly targeting TGFBR1 gene[J]. Cancer Manag Res 2019 , 11: 1641 - 51.
- [2] 桂 婷 , 王丽君 , 储彩婷 , 等. 儿童肾母细胞瘤 Hedgehog 通路相关分子 BMI1 和 Gli1 表达及意义[J]. 临床儿科杂志 , 2019 , 37 (7) : 507 - 11.
- [3] Zhao W , Li J , Li P , et al. Wilms tumor-suppressing peptide inhibits proliferation and induces apoptosis of Wilms tumor cells in vitro and in vivo[J]. J Cancer Res Clin Oncol , 2019 , 145(10) : 2457 - 68.
- [4] 唐美玲 , 肖 萍 , 邹继珍 , 等. LINE1-ORF1p 过表达对肾母细胞瘤细胞 WT_CLS1 增殖的影响[J]. 中国当代儿科杂志 , 2018 , 20(6) : 501 - 7.
- [5] 孙为增 , 林国雄 , 林 海. 沉默钙连蛋白对人肾母细胞瘤细胞凋亡及内质网应激、JNK 信号通路的影响[J]. 山东医药 , 2017 , 57(40) : 22 - 5.
- [6] Luo X , Deng C K , Liu F , et al. HnRNPL promotes Wilms tumor progression by regulating the p53 and Bcl2 pathways[J]. Oncotargets Ther , 2019 , 12: 4269 - 79.
- [7] 刘 卓 , 何 峰 , 李媛媛 , 等. TGF-β 和 IGF-1 信号通路调控肾母细胞瘤细胞增殖机制探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志 , 2017 , 24

- (12): 813-6.
- [8] Liu Z, He F, Ou Y S G, et al. miR-140-5p could suppress tumor proliferation and progression by targeting TGFBR1/SMAD2/3 and IGF-1R/AKT signaling pathways in Wilms' tumor [J]. *BMC cancer*, 2019, 19(1): 405.
- [9] 李丽娜. miR-134 通过介导 CCND1 表达下调抑制食管癌细胞增殖 [J]. *中国老年学杂志*, 2019, 39(21): 5356-8.
- [10] 田艳秋, 李彦强, 周家华, 等. 扩增活化的自体淋巴细胞对肾母细胞瘤的影响 [J]. *广东医学*, 2017, 38(S1): 19-21.
- [11] 仲智勇, 时保军, 周辉, 等. 重组人 p53 腺病毒注射液对肾母细胞瘤细胞增殖、凋亡及自噬的影响 [J]. *中国药房*, 2017, 28(7): 889-92.
- [12] 陈京林, 涛. 肾母细胞瘤患儿外周血调节性 T 细胞和自然杀伤 T 细胞的表达研究 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2016, 18(12): 1222-6.
- [13] Zhao X S, Han B, Zhao J X, et al. MiR-155-5p affects Wilms' tumor cell proliferation and apoptosis via targeting CREB1 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(3): 1030-7.
- [14] 印滇, 杨莉, 张亮, 等. miR-21 通过 PDCD4 调控肝癌细胞的生长和侵袭 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2017, 33(4): 412-6.
- [15] 何少仪, 孙小丽, 黎玉涵, 等. 血清 miR21 在宫颈癌患者手术前后的表达及临床意义 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2018, 25(S1): 10-1, 13.

Effects of miR-21 on STAT3 signaling pathway on proliferation and migration of nephroblastoma cells

Fu Cejun, Wu Lizhen, Chen Zeting, et al

(¹Dept of Pediatric Surgery, ²Operating Room, Hainan Provincial People's Hospital, Haikou 570311)

Abstract Objective To investigate the effect of miR-21 on STAT3 signaling pathway on the proliferation and migration of nephroblastoma cells. **Methods** The expression of miR-21 was detected by RT-PCR in human nephroblastoma and paracancerous tissues. Human nephroblastoma cells were divided into three groups: Blank group, si-miR-21 group (transfected with si-miR-21) and si-miR-21 NC group (transfected with si-miR-21 NC). The expressions of related proteins and apoptosis related proteins in STAT3 signaling pathway were detected by Western blot. The cell proliferation activity was detected by MTS. The cell apoptosis was detected by flow cytometry, and the cell migration ability was detected by Transwell. **Results** The relative expression of miR-21 in human nephroblastoma was significantly higher than that in adjacent tissues ($P < 0.05$). After transfection, there were significant differences in the relative expression of p-STAT3, Bcl-2, Bcl-x1, A490 absorbance value and cell migration number among the three groups ($P < 0.001$). Compared with the Blank group, si-miR-21 group increased ($P < 0.05$), si-miR-21 NC group decreased ($P < 0.05$). There were significant differences in cell apoptosis among the three groups ($P < 0.001$). Compared with the Blank group, si-miR-21 group decreased ($P < 0.05$), si-miR-21 NC group increased ($P < 0.05$). miR-21 was positively correlated with p-STAT3, Bcl-2 and Bcl-x1 ($r = 0.824, 0.778, 0.837; P < 0.001$). **Conclusion** Over expression of miR-21 can promote the proliferation and migration of nephroblastoma cells, which may be due to the up regulation of STAT3 signaling pathway.

Key words miR-21; STAT3 signaling pathway; nephroblastoma; proliferation; migration